

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

¿Existe la enfermedad mixta del tejido conectivo sin anticuerpos anti-U1-RNP?

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Julia Martínez Barrio

Directores

Francisco Javier López Longo
Esperanza Naredo Sánchez
Luis Rodolfo Collado Yurrita

Madrid 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**¿Existe la Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo
sin anticuerpos anti-U1-RNP?**

Julia Martínez Barrio

Directores

Francisco Javier López-Longo

Esperanza Naredo

Luis Rodolfo Collado Yurrita

Madrid, 2017

DEDICATORIA

A Javier López Longo, por transmitirme su pasión por la reumatología pero especialmente su devoción por el paciente. El impulso para realizar esta tesis se debe a él y a su valioso esfuerzo en todos estos años de trabajo.

A Indalecio Monteagudo por su apoyo incondicional como jefe de servicio y a mis compañeros de trabajo por motivarme en el día a día.

A Luis Collado y Esperanza Naredo por su excelente disposición como directores de esta tesis.

A Eduardo Estrada por su trabajo y dedicación.

A mis padres por su ayuda en el gran esfuerzo que requirió este trabajo y a mis hijos por todo su cariño.

Y por sobre todo a mi marido, Marcos, por su infinita paciencia y apoyo para que esta tesis pudiera salir adelante.

Índice

ABREVIATURAS.....	8
ABSTRACT	11
RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN	20
ENFERMEDAD MIXTA DEL TEJIDO CONECTIVO	27
Epidemiología	27
Etiopatogenia	28
Manifestaciones clínicas	30
Pruebas de laboratorio	32
Diagnóstico	35
Tratamiento.....	39
Actividad clínica	40
Mortalidad	42
EMTC en niños	42
EMTC: La controversia	44
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	47
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
MATERIALES Y MÉTODOS	51
Diseño.....	52
Pacientes	52
Variables	53
Estadística	57
RESULTADOS	61
Características demográficas y criterios diagnósticos	62
EMTC seropositiva vs EMTC seronegativa (sin anti-U1 RNP).....	64

EMTC seropositiva y EMTC seronegativa vs pacientes sin EMTC	67
Modelos para predecir o explicar la ausencia de anti-U1-RNP	75
DISCUSIÓN	84
CONCLUSIONES.....	91
REFERENCIAS	94

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Etiopatogenia de las ERAS	22
Figura 2. Genes asociados con el desarrollo de las ERAS	23
Figura 3. Autoanticuerpos característicos de las ERAS	24
Figura 4. Heterogeneidad clínica de las ERAS	26
Figura 5. Patocronia de las ERAS	27
Figura 6. Modelo etiopatogénico de la EMTC	29
Figura 7. SnRNP y estructura secundaria del antígeno U1-RNP	33
 Tabla 1. Criterios de clasificación de la enfermedad mixta del tejido conectivo propuestos por Alarcón-Segovia et al.	 36
Tabla 2. Criterios de clasificación de la enfermedad mixta del tejido conectivo propuestos por Sharp	37
Tabla 3. Criterios de clasificación de la enfermedad mixta del tejido conectivo propuestos por Kasukawa et al.....	38
Tabla 4. Criterios de actividad propuestos para la Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo.....	41
Tabla 5. Criterios diagnósticos de los pacientes de la muestra.....	62
Tabla 6. Diagnósticos de los pacientes con EMTC seropositiva y seronegativa según criterios de Kasukawa	63
Tabla 7. Diagnósticos de los pacientes con EMTC seropositiva y seronegativa según criterios de Alarcón-Segovia.....	63
Tabla 8. Comparación características basales entre pacientes seropositivos y seronegativos usando los criterios de Kasukawa	64
Tabla 9. EMTC seropositiva vs seronegativa con criterios de Kasukawa.....	65

Tabla 10. Comparación características basales entre pacientes seropositivos y seronegativos usando los criterios de Alarcón-Segovia.	66
Tabla 11. EMTC seropositiva vs seronegativa con criterios de Alarcón-Segovia	66
Tabla 12. Variables relacionadas con presentar EMTC seropositiva según criterios de Kasukawa.....	68
Tabla 13. Variables relacionadas con EMTC seropositiva según criterios de Alarcón-Segovia	69
Tabla 14. Variables relacionadas con EMTC seropositiva (vs pacientes sin EMTC)	70
Tabla 15. Variables relacionadas con EMTC seronegativa según criterios de Kasukawa	72
Tabla 16. Variables relacionadas con EMTC seronegativa según criterios de Alarcón-Segovia	73
Tabla 17. Variables que están relacionadas con presentar EMTC seronegativa cuando se compara a los pacientes con EMTC seronegativa vs pacientes sin EMTC	74
Tabla 18 Modelo de regresión logística con EMTC seronegativa según criterios de Kasukawa como variable dependiente.....	76
Tabla 19. Modelo de regresión logística con EMTC seronegativa según criterios de Kasukawa como variable dependiente.....	77
Tabla 20. Modelo de regresión logística con EMTC seronegativa según criterios de Alarcón-Segovia como variable dependiente	78
Tabla 21. Modelo de regresión logística con EMTC seronegativa según criterios de Alarcón-Segovia como variable dependiente	79
Tabla 22. Modelo de regresión logística con anticuerpos anti-U1-RNP detectados por ELISA en la población total como variable dependiente	80

Tabla 23 Modelo de regresión logística con anticuerpos anti-U1-RNP en pacientes con EMTC seropositiva y seronegativa con criterios de Kasukawa como variable dependiente.....81

Tabla 24. Modelo de regresión logística con anticuerpos anti-U1-RNP en pacientes con EMTC seropositiva y seronegativa con criterios de Alarcón-Segovia como variable dependiente..... 82

Tabla 25. Modelo de regresión logística con anticuerpos anti-U1-RNP detectados por ELISA en pacientes con LES como variable dependiente 83

ABREVIATURAS

ACPA: anticuerpos contra proteínas citrulinadas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANA: anticuerpos antinucleares

ANCA: anticuerpos contra el citoplasma del neutrófilo

Anti-DNA: anticuerpos contra el ácido desoxirribonucleico

Anti-ENA: anticuerpos extraíbles del núcleo

AR: artritis reumatoide

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

EMTC: enfermedad mixta del tejido conectivo

EPI: enfermedad pulmonar intersticial

ERAS: enfermedades reumáticas autoinmune sistémicas

ESC: esclerosis sistémica cutánea

ESCD: esclerosis sistémica cutánea difusa

ESCL: esclerosis sistémica cutánea limitada

FR: factor reumatoide

HAP: hipertensión arterial pulmonar

HGUGM: Hospital General Universitario Gregorio Marañón

hnRNP: heterogeneous nuclear RNP

LES: lupus eritematoso sistémico

NINE: neumonía intersticial no específica

PCR: proteína C reactiva

PDM: polimiositis-dermatomiositis

RERAS: registro de enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas

RNP: ribonucleoproteína nuclear

SAF: síndrome antifosfolípido

snRNP: small nuclear RNP

so-ERAS: síndrome de solapamiento ERAS

SSP: síndrome de Sjögren primario

TLR: receptores tipo Toll

VSG: velocidad de sedimentación globular

ABSTRACT

Mixed connective tissue disease (MCTD) is a systemic autoimmune rheumatic disease (SARD), first described by Sharp *et al.* in 1972. It is characterized by the association of clinical manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE), cutaneous systemic sclerosis (SSc) and polymyositis-dermatomyositis (PDM), in the presence of elevated titers of anti-U1-RNP antibodies. Main symptoms of the disease are polyarthritis, hand edema, Raynaud's phenomenon, sclerodactyly, myositis and esophageal hypomotility.

Although widely discussed, most authors today accept MCTD as an independent entity. Others, however, suggest that these patients may belong to subgroups or early stages of certain definite connective diseases, such as SLE or SSc, or are, in fact, SARD overlap syndromes.

In clinical practice, patients with clinical manifestations compatible with MCTD may be identified in the absence of anti-U1-RNP antibodies. This, together with the fact that this disease is the only one where detection of antibodies is a mandatory classification criterion, motivates the realization of this study.

Hypothesis: There are patients with characteristic MCTD clinical manifestations in which no anti-U1-RNP antibodies are detected in serum throughout their evolution.

Objectives: The main objective of this study was to determine if there are patients with symptoms of MCTD without anti-U1-RNP antibodies throughout their evolution. Secondary objectives were to analyze the differences between classical or seropositive MCTD (clinical criteria with anti-U1-RNP antibodies) and seronegative MCTD (clinical criteria without anti-U1-RNP antibodies); and between both types of MCTD and other SARD, including overlap syndromes.

Patients and methods: This was a monocentric, prospective, observational study of patients with SARD. The patients came from the SARD registry of the Hospital General Universitario Gregorio Marañón between 1986 and 2012. Data, collected in a

prospective and protocolized way, included demographic information, clinical manifestations and comorbidities, cardiovascular risk factors, infections, neoplasms and autoantibodies characteristic of SARD. Patients were classified as classical or seropositive MCTD when they met Alarcón-Segovia or Kasukawa's criteria. Patients were considered to have a seronegative MCTD when they fulfilled these criteria but did not present anti-U1-RNP antibodies throughout evolution. The registry is approved by the Hospital Ethics Committee.

Results: Six hundred and ninety-two (692) patients were recruited, 608 women (87.9%). Seventy-seven (10.1%) seropositive and 75 (10.8%) seronegative patients were identified using Kasukawa's criteria. Alarcón-Segovia's criteria identified 62 (8.9%) seropositive and 54 (7.8%) seronegative. There were no significant differences in age at onset, age at diagnosis or time of evolution ($p > 0.05$) between seropositive and seronegative patients. Patients who were seropositive with Kasukawa's criteria presented lymphadenopathy ($p=0.038$, OR 2.275, CI 95% 1.105-0.681), malar rash ($p=0.001$, OR 4.653, CI 95% 1.928-11.231), leukopenia ($p<0.01$; OR 4.824, IC 95% 2.348-9.909), Raynaud's phenomenon ($p=0.046$, OR not calculable), muscle weakness ($p<0.042$, OR 2.125, 95% CI 1.083-4.171) and elevated muscle enzymes ($p<0.049$, OR 2.057, 95% CI, 1.056-4.008) with increased frequency than the seronegative group. With Alarcón-Segovia's criteria, patients who developed myositis were more frequent in the seropositive group ($p = 0.007$, OR 3.25, 95% CI, 1.44-7.32).

When compared to patients without MCTD, seropositive patients according to Kasukawa's and Alarcón-Segovia's criteria presented SSc, diffuse SSc, PDM, arthritis, puffy hands, sclerodactyly, telangiectasia, Raynaud's phenomenon, esophageal hypomotility, pulmonary manifestations, muscular manifestations (myalgias, muscle weakness, increase of muscle enzymes), lymphadenopathy and rheumatoid factor ($p<0.001$). As expected, this group presents a significant increase in the frequency of

anti-U1-RNP antibodies. Up to 20% of patients without MCTD had anti-U1-RNP antibodies.

Regarding patients without MCTD, patients with seronegative MCTD presented a significant increase of SSc, diffuse SSc, overlap syndrome, puffy hands, microstomia, sclerodactyly, telangiectasia, calcinosis, digital ulcers, Raynaud's phenomenon, esophageal hypomotility, pulmonary manifestations (pulmonary fibrosis), myocarditis, arrhythmias, muscle manifestations, ANA with nucleolar pattern and anti-topoisomerase-1 / Scl70 antibodies ($p<0.001$). Patients without MCTD showed a greater association with SLE characteristics (malar rash and anti-DNA antibodies) ($p<0.001$).

In a final phase of the study, several binary logistic regression models were fitted to predict or explain the presence of the anti-U1-RNP antibody from a set of predictor variables whose importance was assessed sequentially by blocks. The probability of presenting anti-U1-RNP antibodies in MCTD, SLE and total group was increased in the presence of SLE manifestations (arthritis, leucopenia and anti-Sm antibodies), SSc manifestations (Raynaud's phenomenon and sclerodactyly) and rheumatoid factor ($OR<1$). Probability of presenting anti-U1-RNP decreased with other SSc manifestations (digital ulcers, pulmonary fibrosis, ANA nucleolar pattern), overlap syndromes and in female patients ($OR>1$).

Conclusions: There are patients with MCTD characteristic clinical manifestations that do not present detectable anti-U1-RNP antibodies in serum throughout their evolution; these patients have similar characteristics to classical MCTD.

RESUMEN

La enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC) es una enfermedad reumática autoinmune sistémica (ERAS) caracterizada por la asociación de manifestaciones clínicas de lupus eritematoso sistémico (LES), esclerosis sistémica cutánea (ESC) y polimiositis-dermatomiositis (PDM), en presencia de títulos elevados de anticuerpos anti-U1-RNP en el suero de los pacientes. Sus principales síntomas son la poliartritis, el edema de manos, el fenómeno de Raynaud, la esclerodactilia, la miositis y la hipomotilidad esofágica.

A pesar de que ha sido ampliamente discutido, actualmente la mayoría de autores acepta a la EMTC como una entidad independiente. Algunos sugieren que estos pacientes podrían pertenecer a subgrupos o etapas tempranas de ERAS definidas, como LES o ESC, o ser, en realidad, síndromes de solapamiento de las ERAS (so-ERAS).

Justificación: En la práctica clínica diaria se pueden identificar pacientes con manifestaciones clínicas compatibles con EMTC en ausencia de anticuerpos anti-U1-RNP. Esto, junto al hecho de que esta enfermedad es la única con detección de anticuerpos como criterio obligatorio para su clasificación, motiva la realización del estudio.

Hipótesis: Existen pacientes con manifestaciones clínicas características de EMTC en los que no se detectan anticuerpos anti-U1-RNP en suero a lo largo de su evolución.

Objetivos: El objetivo principal es demostrar que existen pacientes con características clínicas de EMTC persistentemente anti-U1-RNP negativos a lo largo de su evolución. Los objetivos secundarios son analizar si existen diferencias entre la EMTC clásica o seropositiva (criterios clínicos con anti-U1-RNP positivo) y la EMTC seronegativa (criterios clínicos sin anti-U1-RNP); y entre ambos tipos de EMTC y otras ERAS, incluyendo so-ERAS

Diseño: Estudio observacional prospectivo, en un solo centro, de pacientes con ERAS no seleccionados por diagnóstico.

Pacientes y métodos: Los pacientes del estudio proceden del registro de ERAS del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, entre los años 1986 y 2012. Entre los datos recolectados de forma prospectiva y protocolizada se incluía información demográfica, manifestaciones clínicas y comorbilidades, factores de riesgo cardiovascular, infecciones, neoplasias y autoanticuerpos característicos de ERAS. Se clasificó a los pacientes como EMTC clásica o seropositiva cuando cumplían los criterios de Alarcón-Segovia o los de Kasukawa. Se consideró que el paciente tenía una EMTC seronegativa cuando cumplía dicho criterios pero no presentaba anticuerpos anti-U1-RNP a lo largo de su evolución. El registro cuenta con la aprobación del Comité de Ética hospitalario.

Resultados: Se reclutaron 692 pacientes, 608 mujeres (87,9%). Se identificaron 70 (10,1%) pacientes seropositivos y 75 seronegativos (10,8%) con criterios de Kasukawa y 62 pacientes seropositivos (8,9%) y 54 seronegativos (7,8%) con criterios de Alarcón-Segovia. No se observaron diferencias significativas en la edad al inicio de la enfermedad, edad al diagnóstico o tiempo de evolución ($p > 0,05$) entre seropositivos y seronegativos. Los pacientes seropositivos con criterios de Kasukawa presentaron con mayor frecuencia adenopatías ($p = 0,038$; OR 2,275, IC 95% 1,105-6,81), eritema malar ($p = 0,001$; OR 4,653, IC 95% 1,928-11,231), leucopenia ($p < 0,01$; OR 4,824, IC 95% 2,348-9,909), fenómeno de Raynaud ($p = 0,046$; OR no calculable), debilidad muscular ($p < 0,042$; OR 2,125, IC 95% 1,083-4,171) y aumento de enzimas musculares ($p < 0,049$; OR 2,057, IC 95% 1,056-4,008). Con los criterios de Alarcón-Segovia los pacientes que desarrollaron miositis fueron más frecuentes en el grupo seropositivo ($p = 0,007$; OR 3,25, IC 95% 1,44-7,32).

Con respecto a los pacientes sin EMTC, los pacientes con EMTC seropositiva según los criterios de Kasukawa o los de Alarcón-Segovia presentaron un aumento significativo de ESC, ESC difusa, PDM, artritis, manos edematosas, esclerodactilia, telangiectasias, fenómeno de Raynaud, hipomotilidad esofágica, manifestaciones pulmonares, manifestaciones musculares (mialgias, debilidad muscular, aumento de enzimas musculares), adenopatías y factor reumatoide ($p<0,001$). Lógicamente, este grupo presenta un aumento significativo de la frecuencia de anticuerpos anti-U1-RNP. Hasta un 20% de los pacientes sin EMTC tenía anticuerpos anti-U1-RNP.

Con respecto a los pacientes sin EMTC, los pacientes con EMTC seronegativa presentaban un aumento significativo de ESC, ESC difusa, so-ERAS, manos edematosas, microstomía, esclerodactilia, telangiectasias, calcinosis, úlceras digitales, fenómeno de Raynaud, hipomotilidad esofágica, manifestaciones pulmonares (fibrosis pulmonar), miocarditis, arritmias, manifestaciones musculares, ANA con patrón nucleolar y anticuerpos anti-topoisomerasa-1/Scl70 ($p<0,001$). El grupo de pacientes sin EMTC presentó mayor asociación a características de LES (eritema malar y anticuerpos anti-DNA) ($p<0,001$).

En una última fase del estudio se ajustaron varios modelos de regresión logística binaria para predecir o explicar la presencia del anticuerpo anti-U1-RNP a partir de un conjunto de variables predictoras cuya importancia se valoró secuencialmente por bloques. La probabilidad de presentar anticuerpos anti-U1-RNP tanto en EMTC, LES y grupo total se vio aumentada en presencia de manifestaciones de LES (artritis, leucopenia y anticuerpos anti-Sm) y manifestaciones de ESC (fenómeno de Raynaud y esclerodactilia) y factor reumatoide ($OR<1$). Disminuía la probabilidad de presentar anticuerpos anti-U1-RNP con otras manifestaciones de ESC (úlceras digitales, fibrosis pulmonar, ANA patrón nucleolar), so-ERAS y en pacientes de sexo femenino ($OR>1$).

Conclusiones: Existen pacientes con manifestaciones clínicas características de EMTC que no presentan anticuerpos anti-U1-RNP detectables en el suero a lo largo de su evolución y estos pacientes tienen características semejantes a la EMTC clásica.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas (ERAS) constituyen un grupo homogéneo desde el punto de vista patogénico pero la expresión clínica de cada una de ellas es muy heterogénea. Se caracterizan por el desarrollo de una respuesta inmune persistente e intensa que se manifiesta con la producción de autoanticuerpos y células T autorreactivas dirigidos contra estructuras celulares propias.

Las ERAS tienen unas vías patogénicas comunes. En general, se acepta que uno o varios factores ambientales desencadenan una respuesta inflamatoria aguda y, en individuos genéticamente predispuestos, se desarrolla una inflamación crónica autoinmune. Las agresiones externas como las infecciones, las temperaturas extremas, las radiaciones, los traumatismos, productos químicos, fármacos o venenos; al igual que las internas, sean mutaciones o anomalías congénitas, desencadenan la respuesta del organismo denominada “respuesta tisular” (1). Esta respuesta está controlada por genes y libera los mediadores bioquímicos que ocasionan la inflamación aguda o respuesta inmediata frente a la agresión, con el consiguiente daño tisular.

La respuesta inflamatoria continúa hasta eliminar la noxa y reparar el daño. Con frecuencia, las células no se multiplican y se produce curación con reparación, se forma una cicatriz y el tejido afectado pierde su función especializada. En ocasiones el agente agresor persiste y se produce inflamación crónica, que puede llevar a la curación con reparación pero, si fracasa, permite el desarrollo de la enfermedad. En estos casos, al persistir la agresión, la respuesta aguda mediada por citocinas antiinflamatorias se perpetúa y se produce la liberación de citocinas proinflamatorias (figura 1).

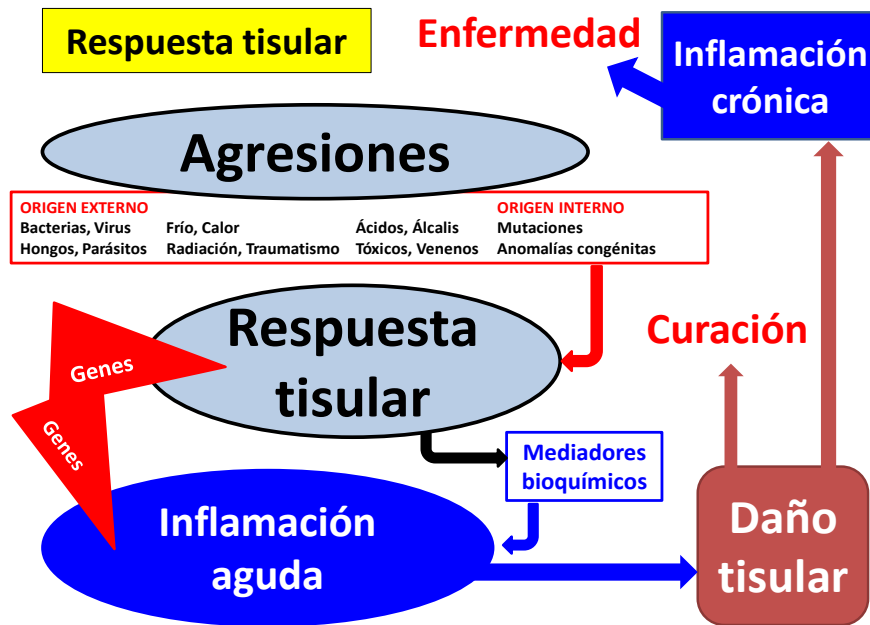
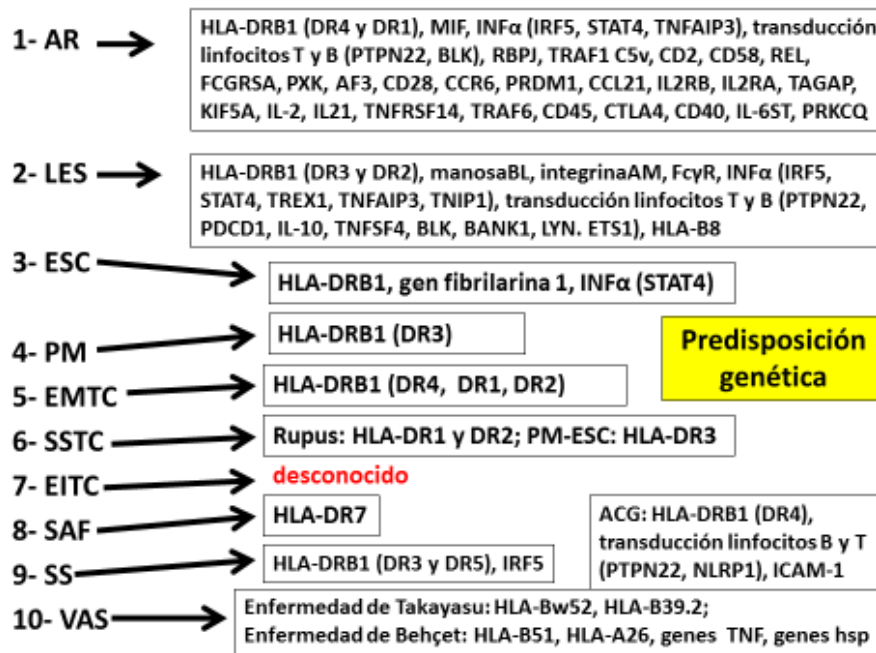


Figura 1. Etiopatogenia de las ERAS

Las células de respuesta rápida propias de la inmunidad innata aumentan la producción de IL-6 y el infiltrado inflamatorio agudo es sustituido por linfocitos T y B, las células de respuesta lenta propias de la inmunidad adquirida, con lo que se transforma en un infiltrado inflamatorio crónico. La consecuencia es el cambio del predominio de citocinas proinflamatorias agudas (IL-8, IL-16, G-CSF) a citocinas proinflamatorias crónicas (TNF-alfa, IFN-gamma, IL-1, IL-6, IL-17 y otras citocinas).

En definitiva, desde un punto de vista patogénico, las ERAS se caracterizan como grupo por presentar predisposición genética, autoanticuerpos característicos y patrones clínicos definidos. En los últimos años se han descrito numerosos genes asociados con las ERAS, sus anticuerpos o sus manifestaciones clínicas (figura 2).

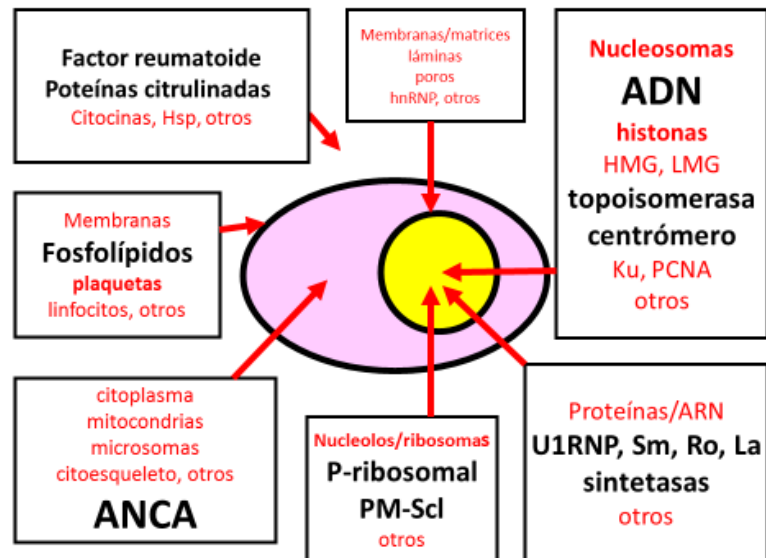


Colaboración FJ López-Longo

AR: artritis reumatoide, LES: lupus eritematoso sistémico, ESC: esclerosis sistémica cutánea, PM: polimiositis, EMTC: enfermedad mixta del tejido conectivo, SSTC: síndrome de solapamiento del tejido conjuntivo, EITC: enfermedad indiferenciada del tejido conectivo, SAF: síndrome antifosfolípido, SS: síndrome de Sjögren, y VAS: vasculitis sistémicas.

Figura 2. Genes asociados con el desarrollo de las ERAS

Las ERAS presentan perfiles característicos de autoanticuerpos y algunos definen subgrupos clínicos. Se han descrito anticuerpos dirigidos contra antígenos localizados en el interior del núcleo celular, en la membrana nuclear, en el citoplasma, en la membrana celular y en el medio extracelular (figura 3).



- 1- AR → anti-péptidos citrulinados, factor reumatoide
- 2- LES → anti-ADN, antinucleosomas, anticromatina
anti-Sm, anti-U1RNP, anti-Ro, anti-La
anti-P-ribosomal, anti-PCNA
- 3- ESC → anti-Scl70, anticentrómero, anti-pol. III, otros
- 4- PM → antisintetasas (anti-Jo1), anti-PM-Scl, otros
- 5- EMTC → anti-U1RNP
- 6- SSTC → anti-PM-Scl, antisintetasas, varios
- 7- EITC → cualquier anticuerpo
- 8- SAF → antifosfolípidos
- 9- SS → anti-Ro, anti-La, factor reumatoide
- 10- VAS → ANCA

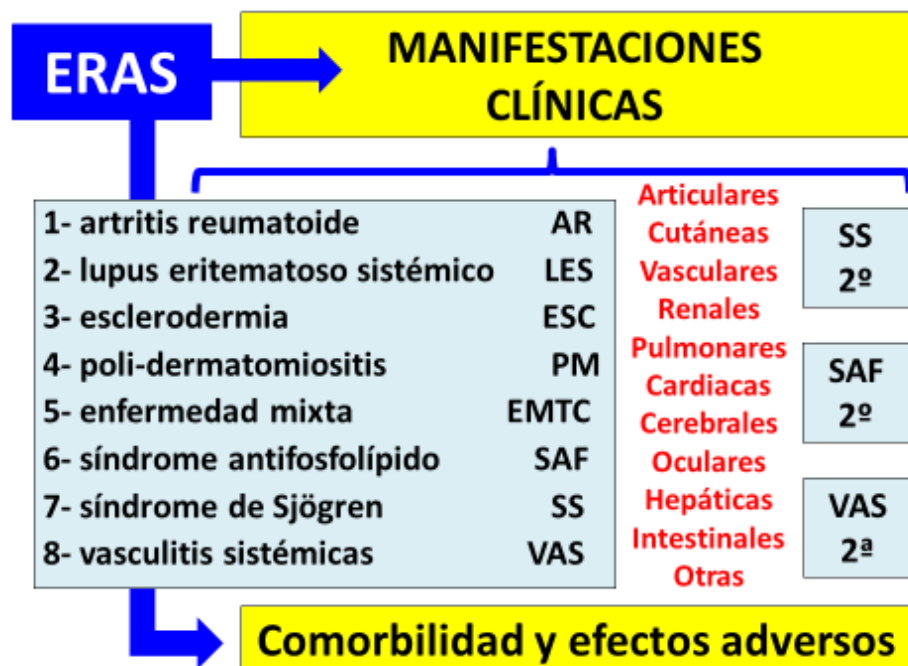
Colaboración FJ López-Longo

ADN: ácido deoxiribonucleico, RNP: ribonucleoproteína, ANCA. Anticuerpos contra citoplasma de neutrófilo humano, PM-Scl: solapamiento polimiositis/esclerodermia, AR: artritis reumatoide, LES: lupus eritematoso sistémico, ESC: esclerosis sistémica cutánea, PM: polimiositis, EMTC: enfermedad mixta del tejido conectivo, SSTC: síndrome de solapamiento del tejido conjuntivo, EITC: enfermedad indiferenciada del tejido conectivo, SAF: síndrome antifosfolípido, SS: síndrome de Sjögren, y VAS: vasculitis sistémicas.

Figura 3. Autoanticuerpos característicos de las ERAS

El reconocimiento de autoanticuerpos asociados a dichas enfermedades les ha conferido un valor diagnóstico en el caso de los anticuerpos anti-ADN (ácido desoxirribonucleico) y anti-Sm en el lupus eritematoso sistémico (LES), anti-Ro/SS-A y anti-La/SS-B en el síndrome de Sjögren (SS), antitopoisomerasa I/Scl-70 y anticentrómero en la esclerosis sistémica cutánea (ESC), anticuerpos específicos de miositis en las polimiositis-dermatomiositis (PDM), factor reumatoide (FR) y anticuerpos contra proteínas citrulinadas (ACPA) en la artritis reumatoide (AR) o ANCA en vasculitis necrotizantes sistémicas. Aun así, en todas estas enfermedades se acepta que un porcentaje variable de los pacientes no presenta dichos anticuerpos a lo largo de su evolución.

Las manifestaciones clínicas de las ERAS se mueven en un espectro muy amplio pudiendo afectar tanto al sistema musculo-esquelético como a órganos internos. En general, cursan con alteraciones cutáneas, musculares, articulares y oculares, asociando en mayor o menor grado manifestaciones de órganos internos, especialmente cardiopulmonares, renales y neurológicas. El fenómeno de Raynaud, la poliartritis, la enfermedad pulmonar intersticial (EPI), la pleuritis, la pericarditis, la vasculitis, la miositis y el síndrome seco son manifestaciones habituales en las ERAS y su aparición es común a las distintas enfermedades. Su etiología es desconocida y multifactorial, interviniendo factores ambientales, genéticos y hormonales, entre otros. Con frecuencia, la evolución de las ERAS es lenta y progresiva (2,3). Cada ERAS tiene un patrón clínico definido pero el espectro de manifestaciones es muy heterogéneo. A estas manifestaciones de la enfermedad hay que añadir la comorbilidad y los efectos adversos de los tratamientos utilizados (figura 4).



Colaboración FJ López-Longo

Figura 4. Heterogeneidad clínica de las ERAS

Además, las ERAS tienen una patocronia común. Como han sugerido Bourn y James (4) en el caso del LES, pueden diferenciarse pacientes con ERAS posible (factores de riesgo genéticos y/o ambientales), ERAS preclínica (alteración de la regulación inmunológica y autoinmunidad preclínica), ERAS incompleta (ERAS-i) (autoinmunidad sin cumplir criterios de clasificación) y ERAS completa (autoinmunidad y criterios de clasificación). Este modelo se puede aplicar a todas las ERAS, tanto en su patogenia como en su expresión clínica (figura 5).



Figura 5. Patocronia de las ERAS

ENFERMEDAD MIXTA DEL TEJIDO CONECTIVO

La EMTC fue descrita por primera vez por Sharp *et al.* en el año 1972 (5,6). Es una entidad clínica caracterizada por una combinación de síntomas y signos de LES, ESC y PM, con anticuerpos dirigidos contra el U1-RNP. Posteriormente se comprobó que estos pacientes pueden presentar además manifestaciones propias de la AR (7). Según las primeras descripciones de la enfermedad, los pacientes con EMTC se caracterizaban por tener una excelente respuesta al tratamiento con corticoides y un pronóstico favorable (5,8).

Epidemiología

La EMTC es una enfermedad rara. En los últimos años, nuevos estudios poblacionales comienzan a esclarecer la incidencia y prevalencia de la EMTC.

Ungprasert *et al.* (9) estudiaron la población de Olmsted County, Minnesota, entre los años 1985 y 2014 identificando 50 casos incidentes con una edad media de aparición de 48,1 años, 84% de los casos se dieron en mujeres. La tasa anual de incidencia en esta serie americana fue de 1,9 por 100000 individuos.

Estudios poblacionales llevados a cabo en Noruega por Gunnarsson *et al.* (10) describen un ratio mujer/varón de 3,3 y una edad media de inicio de la enfermedad más baja, de 37,9 años. La prevalencia en dicho país en el año 2008 se situó en 3,8 casos cada 100000 habitantes con una incidencia anual de 2,1 casos cada millón de habitantes. No se conoce actualmente en España su prevalencia e incidencia local.

Etiopatogenia

La etiología de la EMTC es desconocida y el desarrollo de la enfermedad se debe, probablemente, a la interacción entre factores genéticos y ambientales (figura 6).

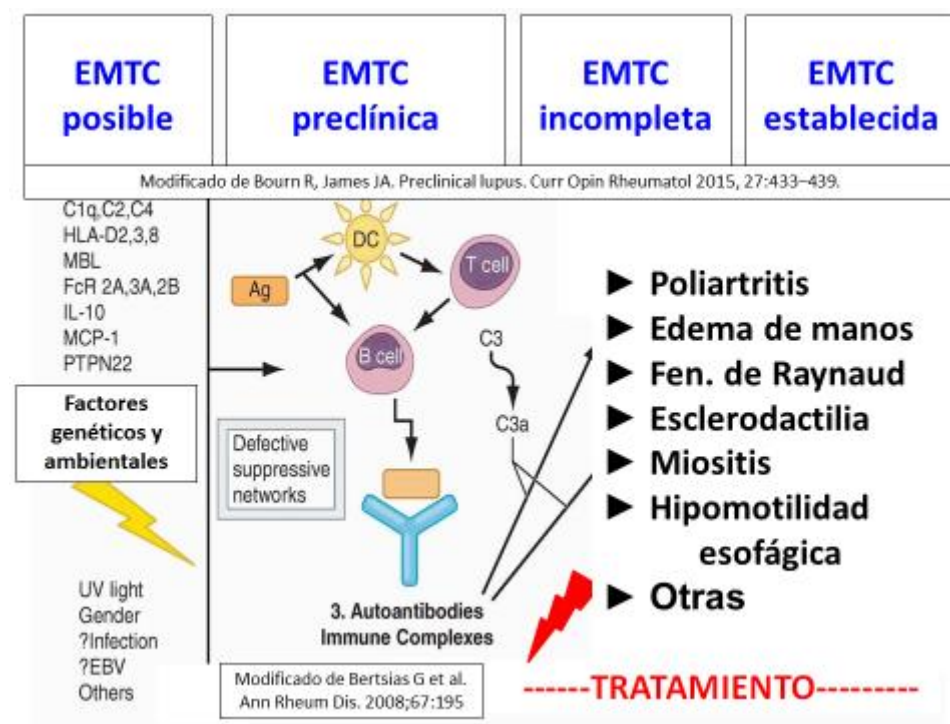


Figura 6. Modelo etiopatogénico de la EMTC

Los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) tienen un papel importante en la presentación de los antígenos al sistema inmunológico. Clásicamente, se ha relacionado al genotipo HLA-DR4 y HLA-DRw53 con la EMTC y anticuerpos anti-U1-70kD (11), pero estudio más recientes sugieren una asociación fuerte al HLA-DRB1*04:01 y B*08 (12,13). Por tanto, la EMTC es genéticamente diferente del LES, cuya predisposición se encuentra asociada al HLA-DR2 y HLA-DR3, HLA-DRB1, HLA-DRB1*0301 y HLA-DRB1*1501 (14); la ESC, asociada al HLA-DR5/11, HLA-DR3 y DR2 o HLA-DQA1*0501 (15); o la PM, asociada al HLA-DR3, HLA-B*0801 y DRB1*0301 (16). Este genotipo diferente afianza la noción de la EMTC como una entidad diferente dentro de las ERAS.

Manifestaciones clínicas

Entre las manifestaciones clínicas más frecuentes se encuentran:

- **Fenómeno de Raynaud:** Se caracteriza por episodios vasoespásticos reversibles, que se manifiestan típicamente con palidez, cianosis y posterior hiperemia por reperfusión (17) en los dedos de las manos y los pies. Es el síntoma inicial en hasta un 50% de pacientes (9) y puede preceder al resto de las manifestaciones clínicas en meses o años.

La capilaroscopia permite la visualización de la microcirculación en el lecho ungueal y es útil para diferenciar el fenómeno de Raynaud primario del secundario (18). La aparición de capilares ensanchados o de morfología distorsionada sugiere una patología subyacente establecida o incipiente (19). Hasta un 31,4% de los pacientes con EMTC presenta en el momento del diagnóstico el patrón típico de la ESC, la presencia de megacapilares y microhemorragias (patrón temprano) o un aumento de estas características asociado a pérdida de capilares (patrón activo) o neoangiogénesis, fibrosis y 'desertificación' (patrón tardío) (20). Durante la evolución de la enfermedad, se observa una progresión leve de las alteraciones (21).

- **Artralgias/artritis:** Se asocian habitualmente con rigidez matutina y suelen ser simétricas y poliarticulares. Afectan de forma preferente a las articulaciones metacarpofalángicas e interfalángicas proximales de las manos y los pies. En la mayoría de los casos no es una artritis deformante pero hasta un 30-35% de los pacientes presentan una artritis erosiva similar a la AR (21).
- **Manos edematosas o “hinchadas”:** La piel aparece engrosada por el depósito de colágeno y edema de forma similar a la que se observa en fases edematosas de la ESC. Es un síntoma inicial en un 16% de pacientes (9).

- **Manifestaciones pulmonares:** Las más frecuentes son la enfermedad pulmonar intersticial (EPI) y la hipertensión arterial pulmonar (HAP). La EPI se concentra habitualmente en las bases pulmonares y las zonas periféricas (22). Los hallazgos más frecuentes en la tomografía axial computarizada de alta resolución (TACAR) son opacidades reticulares intralobulillares, imágenes de vidrio deslustrado y opacidades lineales compatibles con una neumonía intersticial no específica (NINE) (23,24). Entre un 14% y un 60% de los pacientes con EMTC presentan HAP (24,25), con hipertrofia medial, proliferación de la íntima y lesiones plexiformes similares a las encontradas en la HAP secundaria a ESC (26). Debe sospecharse HAP en caso de disnea de esfuerzo, reforzamiento del componente pulmonar del segundo ruido cardíaco a la auscultación, dilatación de la arteria pulmonar en la radiografía de tórax, hipertrofia ventricular derecha en el electrocardiograma o aumento del ventrículo derecho en el ecocardiograma. El diagnóstico definitivo requiere un cateterismo cardíaco que demuestre una presión media de la arteria pulmonar en reposo mayor de 25 mm Hg (27). La HAP es una de las principales causas de muerte en la EMTC (28). Otras manifestaciones pulmonares son el tromboembolismo pulmonar, la hemorragia alveolar, disfunción diafragmática y vasculitis (29).
- **Hipomotilidad esofágica:** El síntoma más común es la disfagia por enfermedad secundaria a reflujo gastroesofágico y aparece en pacientes con manifestaciones clínicas relacionados con la ESC. Se observa una disfunción de los esfínteres esofágicos superior e inferior, con disminución de la presión y de la amplitud del peristaltismo en los dos tercios distales del esófago (30). También se han descrito, aunque de forma menos frecuente, vasculitis

mesentérica, perforación de colon, enteropatía perdedora de proteínas, pancreatitis aguda, hemoperitoneo, diarrea y hepatitis crónica (31).

Otras manifestaciones clínicas en la EMTC son esclerodactilia, miositis de predominio proximal, serositis, afección cardíaca y del sistema nervioso central o periférico (neuropatía del trigémino, cefaleas, hipoacusia neurosensorial) (21,32). Las manifestaciones renales son poco frecuentes en el contexto de la enfermedad (21,33).

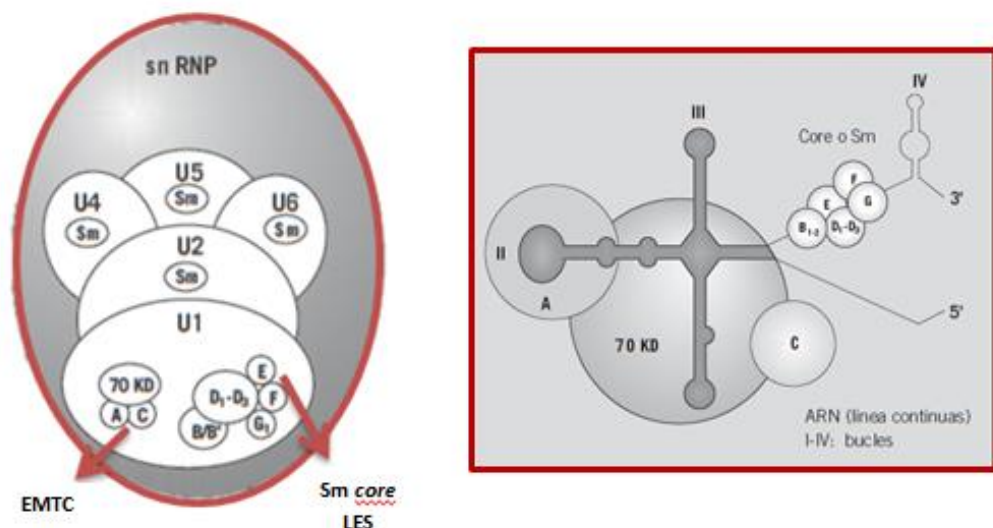
Szodoray et al., en una de las mayores series de pacientes publicadas, con 201 casos de EMTC, han descrito distintos fenotipos de enfermedad con diferencias en su pronóstico (28). Describen 3 grupos o *clusters*:

1. Manifestaciones vasculares. Mayor incidencia de HAP, fenómeno de Raynaud, *livedo reticularis* y trombosis, con anticuerpos anti-células endoteliales y antifosfolípidos.
2. Manifestaciones de ESC y PDM. Mayor frecuencia de EPI, dismotilidad esofágica y miositis, con depósito de inmunocomplejos.
3. Manifestaciones articulares. Artritis erosiva y ACPA positivo similar a lo encontrado en la AR.

Pruebas de laboratorio

En la EMTC es frecuente encontrar anemia inflamatoria crónica de bajo grado o leucopenia, a veces trombocitopenia y anemia hemolítica (34). Serológicamente, el primer indicio para el diagnóstico de la enfermedad es la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) positivos de patrón moteado, a títulos altos (3).

La presencia de concentraciones elevadas de anticuerpos contra U1snRNP (small nuclear ribonucleoproteins), habitualmente del isotipo IgG, constituye el marcador inmunológico característico de estos pacientes. Los diferentes subtipos de RNP forman parte del espliceosoma, una estructura citoplasmática donde el pre-ARN mensajero se transforma y divide en ARN mensajero (ARNm). Las subunidades snRNP y hnRNP (heterogeneous nuclear RNP) constituyen el blanco principal de la autoinmunidad en distintas ERAS. La fracción del espliceosoma identificada como U1-snRNP está formada por una cadena de ARN rica en uridina asociada a 11 proteínas (70 kD, A, C, B, B', D1, D2, D3, E, F y G) (Figura 7).



Modificado de Ruiz Pombo M *et al.* Med Clin (Barc). 2004;1123(18):712–7 (35)

La respuesta inmune se dirige fundamentalmente contra los polipéptidos A, C y 70 kD del U1-RNP en la EMTC; en los pacientes con LES, frente al antígeno Sm. A la derecha, la estructura secundaria del antígeno U1-RNP y U1-ARN. LES: lupus eritematoso sistémico, EMTC: enfermedad mixta del tejido conectivo, SnRNP: small nuclear ribonucleo proteins

Figura 7. SnRNP y estructura secundaria del antígeno U1-RNP

En la EMTC, la respuesta inmune se dirige fundamentalmente contra los polipéptidos 70 kD, A' y C y en LES contra los polipéptidos B, B', D1, D2 y D3 (anti-Sm) (36–38). Aunque la presencia de los anticuerpos anti-U1-RNP es condición *sine qua non* para el diagnóstico de la enfermedad, se desconoce con exactitud su rol en la patogénesis de la EMTC. Se han propuesto distintos modelos sobre la fisiopatología de la EMTC. Es posible que un factor de estrés fisiológico, como una infección viral o exposición a la luz ultravioleta, induzca la liberación de grandes cantidades de material apoptótico. En individuos con un defecto en la eliminación de partículas apoptóticas que contengan RNP, estas partículas encuentran inmunoglobulinas circulantes y células dendríticas. El U1-ARN y adyuvantes de ARN endógenos inducen la activación de células dendríticas y la presentación de antígenos por medio de la señalización vía receptores tipo Toll (TLR). En un huésped con un haplotipo compatible, estas células inducen la activación de células T circulantes específicas del U1-70kD y otros autoantígenos. En un momento fisiológico concurrente o posterior al evento desencadenante que conduce a una nueva liberación de material apoptótico, células B que han escapado a la anergia o delección y son específicas para antígenos como la proteína U1-70 kD, se exponen a su antígeno. Esto conduce a la maduración de células B activadas secretoras de IgG que siguen siendo activadas y segregan autoanticuerpos mientras tengan un autoantígeno y la coestimulación necesaria. En parte de los individuos, estos autoanticuerpos y células T que se producen son capaces de mediar una lesión tisular, derivando en una ERAS (39). En modelos murinos, los anticuerpos anti-U1-RNP han demostrado ser mediadores de la lesión pulmonar (40). Así mismo, se presume que la HAP puede deberse a la activación de células endoteliales inducida por los anticuerpos anti-U1-RNP (41) .

Otros anticuerpos habitualmente presentes incluyen el FR del isotipo IgM positivo casi el 50% los pacientes (42), ACPA (43) y anticuerpos anti-DNA o anticuerpos antifosfolípido en un porcentaje bajo de pacientes, con menor frecuencia de lo que se observa en los pacientes con LES (44,45).

Se han detectado anticuerpos anti-Ro52 en la mitad de los pacientes con fibrosis pulmonar y sólo en el 19% de pacientes sin ella, con una OR: 4.4 (46). La mayoría de los pacientes presenta hipergammagulinemia (47).

Diagnóstico

Las manifestaciones clínicas o de laboratorio suelen aparecer de forma secuencial por lo que muchos pacientes no cumplen los criterios de clasificación de EMTC al inicio de la enfermedad o pueden incluso cumplir criterios de clasificación de LES, ESC, PDM o AR (2).

Dada la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas, se han realizado varias propuestas de clasificación (48–51). Independientemente de su variabilidad clínica, el único criterio indispensable y común a todos ellos para el diagnóstico de la enfermedad es la detección de anticuerpos anti-U1-RNP.

Las tablas 1, 2 y 3 muestran los criterios de clasificación más utilizados.

Tabla 1: Criterios de clasificación de la enfermedad mixta del tejido conectivo propuestos por Alarcón-Segovia *et al.* (48)

A. Serológicos

1. Anti-RNP por hemaglutinación a títulos > 1:1600

B. Clínicos

1. Edema en manos
2. Sinovitis
3. Miositis
4. Fenómeno de Raynaud
5. Acroesclerosis

Se requiere el criterio serológico más al menos 3 criterios clínicos, siempre y cuando se incluyan sinovitis o miositis.

Tabla 1. Criterios de clasificación de la enfermedad mixta del tejido conectivo propuestos por Alarcón-Segovia *et al.*

Los primeros estudios consideraron que los criterios de Alarcón-Segovia, Sharp y Kasukawa eran equivalentes en cuanto a sensibilidad y especificidad (52) o bien que los criterios de Alarcón-Segovia eran superiores (53). Estudios más recientes indican que los criterios de Kasukawa son más sensibles (75%) en comparación con los de Alarcón-Segovia (73%) y Sharp (42%) para clasificar a los pacientes de EMTC a lo largo de su evolución (54).

Tabla 2: Criterios de clasificación de la enfermedad mixta del tejido conectivo propuestos por Sharp (49)

A. Criterios mayores

1. Miositis, grave
2. Afección pulmonar
 - a. Disminución de la capacidad de difusión < 70%
 - b. Hipertensión pulmonar
 - c. Vasculopatía proliferativa en la biopsia pulmonar
3. Fenómeno de Raynaud o hipomotilidad esofágica
4. Esclerodactilia o manos edematosas
5. Anti-ENA >1:10000 y anticuerpos anti-U1-RNP en ausencia de anti-Sm.

B. Criterios menores

1. Alopecia
2. Leucopenia (<4000 leucocitos)
3. Anemia
4. Pleuritis
5. Pericarditis
6. Artritis
7. Neuropatía del trigémino
8. Eritema malar
9. Trombocitopenia
10. Miositis moderada
11. Historia de manos edematosas

Se clasifica al paciente como EMTC cuando se cumplen 4 criterios mayores y EMTC probable cuando se cumplen 3 criterios mayores o 2 mayores y 1 menor, en presencia siempre del criterio mayor nº 5.

Tabla 2. Criterios de clasificación de la enfermedad mixta del tejido conectivo propuestos por Sharp

Tabla 3: Criterios de clasificación de la enfermedad mixta del tejido conectivo propuestos por Kasukawa et al (50)

A. Síntomas comunes

1. Fenómeno de Raynaud
2. Dedos o manos «hinchados»

B. Anticuerpos anti-RNP

C. Miscelánea

1. Manifestaciones lúpicas
 - a. Poliartritis
 - b. Adenopatías
 - c. Eritema malar
 - d. Serositis (pleuritis o pericarditis)
 - e. Citopenias (leucopenia o trombocitopenia)
2. Manifestaciones esclerodermiformes
 - a. Esclerodactilia
 - b. Fibrosis pulmonar, restricción o disminución de la difusión <70%
 - c. Hipomotilidad o dilatación esofágica
3. Miositis
 - a. Debilidad muscular
 - b. Aumento de las enzimas musculares (CK)
 - c. Patrón miopático en el EMG

Se requiere como mínimo uno de los dos síntomas comunes, más anticuerpos anti-U1-RNP positivos, más 1 o más de los síntomas misceláneos en al menos 2 de las 3 categorías.

ENA: antígeno nuclear extraíble; RNP: ribonucleoproteína nuclear; CK: creatinfosfoquinasa; EMG: electromiograma;

Tabla 3. Criterios de clasificación de la enfermedad mixta del tejido conectivo propuestos por Kasukawa et al

Tratamiento

No hay guías de tratamiento específicas para la EMTC. La terapéutica debe individualizarse y adecuarse a la gravedad de las manifestaciones en el momento en que se presenten. El tratamiento es análogo al de otras ERAS por lo que muchas de las medicaciones que se utilizan son propias de LES, ESC, PM o AR. El tratamiento se dirige al control de los síntomas y debe ser precoz ante la aparición de manifestaciones potencialmente graves como la HAP, EPI, miocarditis u otras. La elección del fármaco depende de las manifestaciones clínicas.

Manifestaciones generales como la fatiga, fiebre, artralgias, mialgias, adenopatías, algunas alteraciones hematológicas, lesiones cutáneas no esclerodermiformes y serositis remiten habitualmente con dosis bajas o medias de corticoides (prednisona 5-10 mg/día) o con antipalúdicos (hidroxicloroquina). Para la artritis crónica el tratamiento de inicio, además del corticoide, suele ser el metotrexato (55,56), al igual que para la esclerosis cutánea (esclerodermia) y la miositis (57,58).

El fenómeno de Raynaud de intensidad leve-moderada puede controlarse con medidas generales, como la utilización de guantes y mantener una adecuada temperatura corporal, por lo que no siempre se administra tratamiento farmacológico (17). Cuando es necesario, los antagonistas del calcio son el tratamiento de primera elección. Los inhibidores de la endotelina (bosentan) previenen la aparición de úlceras digitales (59) asociadas a los casos más graves, en los que en ocasiones también se recurre a la infusión intravenosa de prostaglandinas.

Las manifestaciones y por tanto el tratamiento de la enfermedad pulmonar en la EMTC se consideran similares a los de la ESC. En los pacientes con EPI asociada a la

ESC ya se han realizado los primeros ensayos controlados para comparar la eficacia del micofenolato de mofetilo (MMF) vs ciclofosfamida (Scleroderma Lung Study II) (60), con resultados de desenlace favorables para ambos fármacos a nivel pulmonar, pero mejor tolerancia y menos toxicidad para el MMF. El rituximab, un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano que se une específicamente al antígeno CD20 de los linfocitos B también podría tener un papel importante en el tratamiento de esta patología (61).

Los nuevos fármacos, como los antagonistas de la endotelina, los análogos de las prostaglandinas y los inhibidores de la fosfodiesterasa-5 (25,62) han modificado el pronóstico de la HAP en los último años. No menos importantes resultan las medidas de soporte como el uso de oxígeno, diuréticos, dieta baja en sodio, inhibidores de los canales de calcio y la anticoagulación cuando está indicada. En casos graves debe recurrirse al trasplante cardiopulmonar.

En las manifestaciones gastrointestinales el tratamiento suele ser sintomático. Debido a la hipomotilidad esofágica y al reflujo gastroesofágico secundario puede producirse esofagitis por lo que deben utilizarse de forma crónica la metoclopramida, la ranitidina o los inhibidores de la bomba de protones (63).

Actividad clínica

Para determinar la eficacia de los nuevos tratamientos se ha hecho necesario definir la actividad de la enfermedad. En la práctica clínica diaria, se utilizan criterios de actividad “prestados” de otras enfermedades como AR o LES (64–67). En 2010, Lage *et al.* propusieron los criterios de actividad de la EMTC que figuran en la tabla 4 (68).

Tabla 4: Criterios de actividad propuestos para la Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo (68)	
A) <u>Manifestaciones mayores:</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Vasculitis cutánea • Disminución de la función pulmonar • Manifestaciones del SNC • Miositis severa • Cilindros urinarios/ proteinuria
B) <u>Manifestaciones menores:</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Artritis • Rash cutáneo • Diarrea • Miositis leve • Pérdida de peso
C) <u>Laboratorio:</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Linfopenia o trombocitopenia • Aumento de CPR o VSG. • Hipergammaglobulinemia
<p>Enfermedad activa:</p> <p>2 A</p> <p>1 A + 2 B</p> <p>3 B + C</p>	

PCR: proteína C reactiva; VSG: velocidad de sedimentación globular

Tabla 4. Criterios de actividad propuestos para la Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo

Estos criterios no han sido validados y se necesitan estudios prospectivos para determinar la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivos y negativos.

Independientemente de la controversia sobre su nomenclatura, el hecho de que la EMTC identifique a un grupo de pacientes en los que puede haber una afectación de órganos vital, hace necesario un consenso para la vigilancia de manifestaciones específicas y la estratificación pronóstica según diferentes criterios clínicos y serológicos, con el fin de mejorar la calidad de la atención al paciente.

Mortalidad

De modo similar a lo que observamos en los pacientes con ESC (69,70), la HAP es la principal causa de muerte en la EMTC (21) por lo que su diagnóstico precoz resulta imprescindible. Las herramientas de diagnóstico indispensables son, además de la evaluación clínica, las pruebas de función respiratoria y el ecocardiograma. El diagnóstico se confirma midiendo la presión de la arteria pulmonar mediante cateterismo cardíaco. En la actualidad, con los tratamientos disponibles tanto inmunosupresores como antagonistas de la endotelina, prostanoïdes e inhibidores de la fosfodiesterasa-5, la supervivencia de los pacientes con HAP ha mejorado notablemente (33). El estudio REVEAL (*Registry to Evaluate Early and Long-term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management*), en el que se incluyeron pacientes con HAP asociada a ERAS en 54 centros de Estados Unidos, encontró que las tasas de supervivencia a un año fueron menores en pacientes con ESC que en otras ERAS como LES o AR y similares en pacientes con EMTC (71). Otras causas importantes de muerte son la EPI (22) y la miocarditis (72).

EMTC en niños

Hasta un 23% de los casos de EMTC se presentan en la infancia o adolescencia. La edad media de comienzo es en torno a los 11 años (73,74), con un rango de 2 a 16 años. El ratio mujer/varón en esta etapa es de 6:1 (75).

En 55 pacientes pediátricos de Hetlevik *et al*, una de las series más largas publicadas hasta la fecha, las manifestaciones más frecuentes a lo largo de la enfermedad fueron el fenómeno de Raynaud (100%), la artritis (94%), las manos edematosas (77%) y la afectación pulmonar (58%). Los hallazgos típicos de LES (artritis, eritema facial, serositis, leucopenia) y la PDM (debilidad muscular, elevación de enzimas musculares, EMG alterado) fueron más evidentes en el momento del diagnóstico. La frecuencia de estas manifestaciones disminuyó en el transcurso de la enfermedad dando paso al predominio de manifestaciones de ESC (esclerodactilia, afección pulmonar, dismotilidad esofágica) (74). Se ha sugerido que la afección pulmonar podría ser menos común que en la población adulta (22,74,76,77). En la cohorte previamente mencionada, la mortalidad fue de un 51,8% después de una media de 16,8 años de seguimiento. Ninguna de las muertes fue por EPI.

Las manifestaciones hematológicas incluyendo anemia, leucopenia y trombocitopenia son comunes. Serológicamente, se observan títulos altos de ANA junto al anti-U1-RNP. El FR también es positivo en un número significativo de pacientes (70%), en menor medida también se encuentran anticuerpos anti-Sm (10%), anti-DNA (20%), anti-Ro (13%) y anti-La (14%) (75).

Como sucede en los adultos, la EMTC juvenil no tiene un tratamiento específico, sino que es similar al de otras ERAS. Los corticoides, antipalúdicos y metotrexato serán los medicamentos de primera línea. Cabrera *et al*. reportan la mejoría de dos niños en tratamiento con tocilizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el receptor de la IL-6 y con indicación en la AIJ (78), dicha mejoría fue especialmente notable a nivel articular (79). También existen comunicaciones de casos tratados con rituximab (80).

EMTC: La controversia

Los conceptos de síndrome de solapamiento (pacientes que presentan manifestaciones de dos o más ERAS definidas) y EMTC son controvertidos (37,54,81–83). Sea porque su etiología se encuentra menos definida o porque se piensa que estas entidades devienen en otro proceso reumatológico, hay quienes sostienen que la EMTC es en realidad un síndrome de solapamiento o una fase indiferenciada y temprana de otra ERAS. La controversia en cuanto a la existencia de la EMTC aún persiste. A pesar de que entidades bien definidas, como por ejemplo LES, se asume que puedan ser muy heterogéneas y tener un amplio espectro de características clínicas y serológicas (84,85) que pueden cambiar con el tiempo, la EMTC no goza de este beneficio.

Las principales objeciones al concepto de EMTC como entidad independiente (82,83) son las siguientes:

- Los pacientes con EMTC pueden evolucionar a otras ERAS definidas.
- La EMTC fue descrita como una enfermedad relativamente benigna, pero no es infrecuente que curse con manifestaciones orgánicas graves.
- Los anticuerpos anti-U1-RNP no son exclusivos de la EMTC y pacientes con datos típicos de EMTC tienen otros anticuerpos aparte del anti-U1 RNP.
- No hay aún un conjunto de criterios diagnósticos o de clasificación que esté ampliamente aceptado.

Estas controversias asociadas a la aparente rareza de la enfermedad y la escasa información epidemiológica ha hecho difícil planificar y diseñar estudios sobre la EMTC, incluso se ve reducida la posibilidad de estudios comparativos con otras ERAS.

Por otra parte, el concepto de EMTC como entidad definida (82) se asienta en la existencia de un patrón clínico determinado, un anticuerpo característico y unos hallazgos inmunológicos y genéticos específicos:

- La EMTC tiene un patrón clínico específico caracterizado por la asociación de fenómeno de Raynaud, artralgias o poliartritis, tumefacción en las manos con aspecto de dedos en salchicha, hipomotilidad esofágica y miositis. El solapamiento de las manifestaciones de LES, ESC y PDM que configuran los criterios de clasificación es secuencial. La capacidad de los pacientes con EMTC para desarrollar manifestaciones características de otras ERAS debe considerarse como una expresión clínica, más que como una diferenciación. Aunque en su evolución los pacientes con EMTC pueden cumplir los criterios de clasificación de más de una ERAS definida (86), no son estrictamente síndromes de solapamiento si se asume que este término define los pacientes con dos enfermedades que coexisten de forma independiente.
- Los anticuerpos anti-U1-RNP son característicos de la EMTC. Los pacientes con títulos elevados de anticuerpos anti-U1-RNP sin criterios de EMTC u otras ERAS, suelen evolucionar a EMTC en 2 años. En cambio, los pacientes con títulos bajos suelen desarrollar LES u otras ERAS definidas (87).
- Los pacientes con EMTC tienen factores genéticos específicos. A diferencia de lo observado en el LES o la ESC, la EMTC se relaciona fundamentalmente con el HLA-DR4, en particular DRB1*15:01, DRB1*04 y *09:01 (12).

Por lo tanto, el concepto de EMTC es útil en la definición de un subgrupo de pacientes con características clínicas, perfil de tratamiento y pronóstico únicos y diferentes al resto de ERAS.

En el caso de la EMTC y del SAF, los criterios de clasificación (48–50,88) exigen siempre la detección de anticuerpos anti-U1-RNP y antifosfolípidos, respectivamente. Recientemente, se ha reconocido la existencia de pacientes con SAF seronegativo (89), es decir, pacientes con manifestaciones clínicas sugestivas de SAF cuyas determinaciones de anticuerpos anticardiolipina (ACA), anticoagulante lúpico (AL) y anti- β 2-glicoproteína-1 (anti- β 2-GP1) son persistentemente negativas con las técnicas de laboratorio rutinarias. Entonces, y con el mismo razonamiento, ¿Podríamos encontrar pacientes con manifestaciones de EMTC sin detectarse anticuerpos anti-U1-RNP?

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En la práctica clínica diaria se pueden identificar pacientes con manifestaciones clínicas compatibles con EMTC en los que no se detectan anticuerpos anti-U1-RNP.

En estos casos existen cuatro posibles explicaciones:

- 1- El diagnóstico es erróneo y no tienen EMTC
- 2- Los anticuerpos anti-U1-RNP han desaparecido
- 3- Los anticuerpos anti-U1-RNP aún no han aparecido
- 4- Los pacientes tienen realmente una EMTC sin anticuerpos anti-U1-RNP (seronegativa).

Además, la EMTC es la única ERAS en la que es obligatoria la detección de anticuerpos para su clasificación [2-5], por lo que debe valorarse si existen pacientes con EMTC seronegativa.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Existen pacientes con manifestaciones clínicas características de EMTC que no presentan anticuerpos anti-U1-RNP detectables en el suero a lo largo de su evolución.

Objetivo principal

- Determinar si existen pacientes con las características clínicas de EMTC sin que se detecten anticuerpos anti-U1-RNP a lo largo del tiempo (EMTC seronegativa).

Objetivos secundarios

- Estudiar las diferencias entre EMTC seropositiva (anti-U1-RNP positivo) y EMTC seronegativa (criterios clínicos sin anti-U1-RNP).
- Establecer las diferencias entre los pacientes con EMTC seropositiva o seronegativa y otras ERAS definidas (LES, PM, ESC) o los síndromes de solapamiento.
- Estudiar las manifestaciones clínicas y serológicas asociadas a la detección de anticuerpos anti-U1-RNP en pacientes diagnosticados de ERAS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño

Estudio observacional prospectivo, en un solo centro, de pacientes con ERAS no seleccionados por diagnóstico.

Pacientes

Todos los pacientes incluidos en el estudio proceden del “Registro de ERAS” (RERAS) del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid (RERAS-HGUGM) coordinado por FJ López-Longo, entre 1986 y 2016, que se ha desarrollado con los siguientes objetivos:

- Estudiar la frecuencia y las características clínicas asociadas con los anticuerpos relacionados con las diferentes ERAS.
- Comparar las tasas de mortalidad y las causas de muerte de las ERAS.
- Estudiar la evolución clínica de los pacientes con ERAS clasificados según las manifestaciones iniciales de su enfermedad.
- Estudiar la comorbilidad asociada en los pacientes con ERAS, con especial atención a los factores de riesgo cardiovascular, las infecciones graves y las neoplasias malignas) (87,90,91).

En la primera visita o visita de entrada se recogieron los datos demográficos, las primeras manifestaciones clínicas relacionadas con la ERAS y las manifestaciones clínicas acumuladas entre el inicio de la enfermedad y la primera visita, según un protocolo estándar especialmente diseñado. Además, se obtuvieron muestras de suero que se almacenaron a -40°C para poder detectar anticuerpos correspondientes a la primera visita, incluso aquellos anticuerpos aún desconocidos al inicio del estudio. Cada paciente fue revisado al menos una vez cada 2 años por el mismo investigador (FJ López Longo).

El RERAS-HGUGM incluye pacientes diagnosticados de AR (92), LES (84), ESC (93), PDM (94–96), EMTC (48–50), SSP (97), SAF primario (88,98), so-ERAS (cuando el paciente cumple criterios de clasificación de AR, LES, ESC y/o PDM de forma simultánea o secuencial) y vasculitis sistémicas. Se incluyeron también pacientes con uno o más autoanticuerpos relacionados con ERAS y al menos uno de los hallazgos clínicos utilizados como criterio de clasificación de ERAS, sin cumplir criterios de ninguna de las ERAS antes mencionadas. Estos pacientes fueron diagnosticados de ERAS incompletas o indefinidas.

En este estudio se incluyeron todos los pacientes con ERAS definidas (completas) e indefinidas (incompletas), excepto aquellos diagnosticados exclusivamente de AR (criterio de exclusión). Se seleccionaron los pacientes que cumplieran los criterios clínicos para la clasificación de EMTC según los criterios de Alarcón-Segovia (48) y los criterios de Kasukawa (50), con o sin anticuerpos anti-U1-RNP detectados en al menos 2 muestras. Se dividieron en pacientes con EMTC seropositiva (con anticuerpos anti-U1-RNP) y EMTC seronegativa (sin anticuerpos anti-U1-RNP). El grupo definido como seropositivo presenta anticuerpos anti-U1-RNP, mientras que el seronegativo no los presenta. El registro cuenta con la aprobación del Comité de Ética hospitalario.

Variables

Se recogieron las siguientes variables clínicas:

- Características al inicio de la enfermedad: primera manifestación clínica o hallazgo de laboratorio relacionados con las ERAS.
- Historia familiar: enfermedad autoinmune en parientes de primer y/o segundo grado.

- Características durante la evolución de la enfermedad: datos clínicos y de laboratorio acumulados a lo largo de su evolución.
 - Síntomas constitucionales: malestar general o adenopatías (nódulos ≥ 0.5 cm en región cervical, axila o ingle, en ausencia de infección o malignidad).
 - Fiebre: temperatura $\geq 38^{\circ}\text{C}$ en ausencia de infección.
 - Manifestaciones renales: proteinuria persistente de rango nefrótico o no nefrótico, cilindros celulares de cualquier tipo, hematuria >6 eritrocitos por campo (en ausencia de sangrado menstrual), elevación de la creatinina en sangre >0.98 mg/dL, o histología compatible.
 - Manifestaciones cutáneas: erupción malar en “alas de mariposa”, lupus discoide, fotosensibilidad, úlceras orales, alopecia, vasculitis cutánea, edema de manos, microstomía, esclerodermia, esclerodactilia, telangiectasias, calcinosis, úlceras digitales, pápulas de Gottron, heliotropo, mano de mecánico.
 - Manifestaciones pulmonares: pleuritis con o sin derrame pleural, hemorragia pleural o pulmonar, EPI, HAP.
 - Manifestaciones cardiovasculares: miocarditis, pericarditis, arritmias, valvulopatía, enfermedad coronaria con infarto de miocardio o eventos trombóticos.
 - Fenómeno de Raynaud.
 - Hipertensión: presión sistólica >140 mm Hg o diastólica >90 mm Hg.
 - Manifestaciones hematológicas: anemia hemolítica, leucopenia ($<4,000/\text{mm}^3$), linfopenia ($<1,300/\text{mm}^3$) y trombocitopenia ($<100,000/\text{mm}^3$), en ausencia de medicaciones que puedan justificarlas.

- Manifestaciones neuropsiquiátricas: convulsiones, psicosis, síndrome orgánico cerebral, neuropatía craneal o periférica, ictus, mielitis transversa, cefalea asociada al lupus o corea.
- Manifestaciones musculoesqueléticas: poliartralgias, debilidad o dolor muscular, elevación de enzimas musculares, electromiografía compatible o hallazgos en biopsia típicos de miositis, o artritis (sensibilidad, edema o derrame no traumáticos, en al menos 2 articulaciones).
- Manifestaciones gastrointestinales: hipomotilidad esofágica, alteraciones intestinales.
- Serositis: pleuritis (historia de dolor tipo pleurítico, frote pleural objetivado por un médico o evidencia de derrame pleural) y pericarditis (objetivada por ECG, frote pericárdico o evidencia de derrame pericárdico).
- Muerte: mortalidad por cualquier causa, incluida la relacionada a ERAS, sus complicaciones y sus tratamientos.

En todos los pacientes se realizaron de rutina, en la primera visita y después al menos 1 vez al año, los siguientes estudios: velocidad de sedimentación globular (VSG), proteína C reactiva, hemograma completo, glucemia, ácido úrico, bioquímica hepática y renal, colesterol (total, HDL y LDL), triglicéridos, creatinfosfoquinasa, aldolasa, proteínas totales y espectro electroforético, fracciones C3 y C4 del sistema de complemento e inmunoglobulinas (sangre); y estudio elemental y sedimento (orina). El resto de los estudios de laboratorio se realizaron solo en caso de existir indicación clínica. Los anticuerpos se detectaron de forma rutinaria en la Sección de Autoinmunidad del Servicio de Inmunología en la primera visita, en una segunda

determinación pasadas al menos 12 semanas para confirmar el resultado positivo o negativo y, posteriormente, en caso de producirse algún cambio clínico que justifique una nueva petición. Los anticuerpos incorporados a la rutina después de iniciado el registro se estudiaron en la muestra almacenada en la primera visita.

Los anticuerpos no órgano-específicos se analizaron por inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre cortes tisulares congelados de rata (riñón, hígado y estómago) y cultivos de células epiteliales HEp-2 (Mardx Diagnostics, Carlsbad, California, USA), utilizando un conjugado con fluoresceína (DAKO, Copenhagen, Dinamarca). El factor reumatoide (FR) se midió mediante nefelometría (Beckman, Fullerton, California, USA). Los anticuerpos contra el ADN de doble cadena (anti-ADN) se midieron por radioinmunoanálisis (Anti-DNA kit IM77, Kodak Clinical Diagnostics Ltd, Amesham, UK) o ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Rheuma ELISA TM System, Whittaker Bioproducts, Walkersville Maryland, USA).

Los anticuerpos anti-RNP, anti-Sm, anti-Ro/SS-A y anti-La/SS-B, se detectaron mediante técnicas de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Las técnicas de ELISA utilizadas podían detectar en suero IgG, IgM e IgA de manera simultánea (Rheuma ELISA TM System, Whittaker Bioproducts, Walkersville Maryland, USA) o IgG de manera aislada (EIA gen Combi 4 kit, IFCI Clonesystems SpA, Casalecchio Di Reno, Bologna, Italia). Los sueros fueron diluidos a 1:100. Los valores de densidad óptica (DO) fueron las medias de 450 nm de DO obtenidos para cada muestra realizada por duplicado. El punto de corte se definió como la media de 90 controles ± 3 DS. La variabilidad inter-test determinada entre los laboratorios locales durante el período de estudio fue <5%.

Estadística

En una primera fase se compararon dos grupos de casos con EMTC. Uno de ellos no presentaba anticuerpos anti-U1-RNP (EMTC seronegativa), mientras que el otro sí (EMTC seropositiva). El objetivo fue comprobar si ambos grupos eran equivalentes en todas las demás variables. Para el diagnóstico de la EMTC se emplearon independientemente los criterios de Kasukawa y Alarcón-Segovia.

Se utilizó la prueba Chi Cuadrado de McNemar para comparar la prevalencia en la muestra de casos de EMTC con anti-U1-RNP con la prevalencia de casos EMTC sin anti-U1-RNP. Se utilizó la prueba Chi Cuadrado de Pearson para estudiar la relación entre presencia de este anticuerpo y las variables categóricas del estudio. Se aplicó la corrección de Yates cuando fue necesario. Se aplicó la prueba t de Student para muestras independientes para estudiar la relación entre presencia de anti-U1-RNP y las variables cuantitativas. Se corrigió la tasa de error mediante el método de Bonferroni.

La comparación de la variable de desenlace con las variables secundarias se realizó con la prueba de la t de Student y cuando no fue posible, con pruebas no paramétricas (Mann-Whitney). La asociación con las variables categóricas se analizó mediante la prueba de chi cuadrado de Pearson y el cálculo de “*odds ratio*” con sus respectivos intervalos de confianza. Se estudió el patrón de asociación multivariante mediante regresión logística.

En una segunda fase se compararon los pacientes con EMTC seropositiva con los pacientes sin EMTC (a) y los pacientes con EMTC seronegativa con los pacientes sin EMTC (b) para comparar si las diferencias que se encuentran en la

comparación “a” son las mismas que de la comparación “b”. Para el diagnóstico de EMTC se emplearon independientemente los criterios de Kasukawa y Alarcón-Segovia.

Para estudiar la relación entre EMTC y las variables categóricas del estudio se utilizó la prueba Chi Cuadrado de Pearson. Se evaluó la fuerza de las asociaciones mediante el coeficiente C de contingencia de Pearson y la V de Cramer. Estos dos índices toman valores entre 0 para asociación nula y cerca de 1 para asociación máxima. Se aplicó la corrección de Yates cuando fue necesario.

Se aplicó la prueba t de Student para muestras independientes para estudiar la relación entre EMTC y las variables cuantitativas. Se calculó el intervalo de confianza para la diferencia de medias entre el grupo EMTC y no EMTC en cada caso. Se corrigió la tasa de error mediante el método de Bonferroni.

En una tercera fase se ajustaron varios modelos de regresión logística binaria para predecir/explicar la presencia del anticuerpo anti-U1-RNP a partir de un conjunto de variables predictoras cuya importancia se valoró secuencialmente por bloques.

1. En primer lugar, se ajustó un modelo de regresión logística para estudiar qué variables que se asocian a la presencia de anticuerpos anti-U1-RNP por detectados por ELISA en la población total de pacientes.
2. En segundo lugar, se ajustó otro modelo de regresión logística para estudiar qué variables se asocian con presentar EMTC seronegativa. Esta última regresión se ajustó dos veces; una para EMTC según los criterios de Kasukawa y otra según los criterios de Alarcón-Segovia.

Las variables predictoras se introdujeron al modelo secuencialmente en tres bloques distintos. En cada bloque, solo se incluyeron en el modelo aquellas variables que contribuyeron a mejorar significativamente el ajuste (las predicciones del modelo). Se realizó la selección hacia delante utilizando como criterio la Razón de Verosimilitud (*Forward selection through Likelihood Ratio*).

- En el bloque 1 se consideraron las variables ESC, PM, LES, solapamientos, tiempo de evolución y sexo.
- En el bloque 2 se consideraron las variables artritis, manos edematosas, Raynaud, fibrosis pulmonar.
- En el bloque 3 se consideraron las variables poliartritis crónica, rigidez matutina, esclerodermia difusa, esclerodactilia, telangiectasias, manifestaciones pulmonares, manifestaciones musculares, debilidad muscular, aumento de enzimas musculares, adenopatías, FR, eritema malar, microstomía, calcinosis, miocarditis, arritmias, ANA patrón nucleolar, anticuerpos anti-ADN, anticuerpos anti SCL-70, máximo valor detectado de VSG, anticuerpos anti-PCC, osteoporosis.

Se informa solo del modelo final, tras haber considerado todos los predictores de todos los bloques. Para facilitar la interpretación de las *odds ratio*, todas las variables se recodificaron como 0=no y 1=sí.

Se puede saber si una variable está significativamente asociada con el anticuerpo anti-U1-RNP o no por su valor *p*, y también por el intervalo de confianza para su *odds ratio*:

- Las variables cuyo intervalo de confianza para la *odds ratio* queda por encima de 1 (en otras palabras, el límite inferior es mayor de uno), se asocian

positivamente con la presencia de anticuerpos anti-U1-RNP ($p < 0,05$). Esto significa que la presencia de esa característica aumenta la probabilidad de RNP.

- Las variables cuyo intervalo de confianza para la *odds ratio* queda por debajo de 1 (en otras palabras, el límite superior es menor de uno), se asocian negativamente con la presencia de anticuerpos anti-U1-RNP ($p < 0,05$). Esto significa que la presencia de esa característica disminuye la probabilidad de presentar el anticuerpo.
- Si el intervalo de confianza de la *odds ratio* comprende el uno (el uno queda entre el límite inferior y superior), quiere decir que la asociación no es estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

RESULTADOS

Características demográficas y criterios diagnósticos

Entre 1986 y 2012 se incluyeron en el estudio 692 pacientes, 608 mujeres (87,9%). El ratio mujer/hombre en la población total fue de 7/1. La edad media al inicio de la enfermedad fue de 37,5 ($\pm 17,64$) años y el tiempo de evolución de la enfermedad de 14,83 ($\pm 9,54$) años. En la tabla 5 se describen los criterios diagnósticos que cumplían los pacientes de la muestra al inicio y durante su evolución.

Diagnóstico (n=692)	n	%
EMTC seropositiva (criterios Kasukawa)	70	10,1
EMTC seronegativa (criterios Kasukawa)	75	10,8
EMTC seropositiva (criterios Alarcón-Segovia)	62	9,0
EMTC seronegativa (criterios Alarcón-Segovia)	54	7,8
Lupus eritematoso sistémico	487	70,5
Esclerodermia	131	19,0
Polimiositis	131	19,0
Síndrome de solapamiento	52	7,5
Síndrome antifosfolípido primario/secundario	110	15,9
Síndrome de Sjögren primario/secundario	161	23,3
Vasculitis	43	6,2

EMTC: enfermedad mixta del tejido conectivo

Tabla 5. Criterios diagnósticos de los pacientes de la muestra.

Las tablas 6 y 7 muestran los diagnósticos que cumplían los pacientes con EMTC seropositiva y seronegativa según criterios de Kasukawa y Alarcón-Segovia respectivamente.

	EMTC seropositiva n=70		EMTC seronegativa n=75				IC 95% OR	
	n	%	N	%	p	OR	Inf	Sup
LES	51	73%	19	26%	<0,005	7,770	3,702	16,307
ESC	24	34%	45	61%	<0,005	0,336	0,170	0,663
PDM	25	36%	22	30%	0,557	1,313	0,653	2,640
So-ERAS	0	0%	15	20%	<0,005	no calculable		

EMTC: enfermedad mixta del tejido conectivo, LES: lupus eritematoso sistémico, ESC: esclerosis sistémica cutánea, PDM: polimiositis-dermatomiositis, so-ERAS: síndrome de solapamiento de enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas

Tabla 6. Diagnósticos de los pacientes con EMTC seropositiva y seronegativa según criterios de Kasukawa

	EMTC seropositiva n=62		EMTC seronegativa n=54				IC 95% OR	
	n	%	n	%	p	OR	Inf	Sup
LES	45	73%	13	24%	<0,005	8,348	3,757	18,543
ESC	21	34%	32	59%	<0,005	0,352	0,165	0,747
PDM	28	45%	16	30%	0,14	1,739	0,820	3,686
So-ERAS	0	0%	10	18%	<0,005	no calculable		

EMTC: enfermedad mixta del tejido conectivo, LES: lupus eritematoso sistémico, ESC: esclerosis sistémica cutánea, PDM: polimiositis-dermatomiositis, so-ERAS: síndrome de solapamiento de enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas

Tabla 7. Diagnósticos de los pacientes con EMTC seropositiva y seronegativa según criterios de Alarcón-Segovia

EMTC seropositiva vs EMTC seronegativa (sin anti-U1 RNP)

En la primera fase del estudio se compararon dos grupos de casos con criterios clínicos de EMTC, aquellos que presentaban anticuerpos anti-U1-RNP (EMTC seropositiva), con los que no los presentaban (EMTC seronegativa).

a- EMTC seropositiva vs seronegativa con criterios de Kasukawa

No se observaron diferencias significativas en la edad al inicio de la enfermedad, edad el momento del diagnóstico o tiempo de evolución. En la tabla 8 se comparan las características basales de los pacientes según presentaran o no anticuerpos anti-U1-RNP.

	EMTC seropositiva (n=70)		EMTC seronegativa (n=75)		t Student
	mediana	DS	mediana	DS	p
Edad inicio enfermedad	41	17,7	33	17,3	0,184
Edad diagnóstico	52	18,1	53	16,9	0,754
Tiempo de evolución	14	9,8	19	9,6	0,067

DS: Desviación estándar, EMTC: enfermedad mixta de tejido conectivo

Tabla 8. Comparación características basales entre pacientes seropositivos y seronegativos usando los criterios de Kasukawa

Cuando se compararon a los pacientes por la presencia de los distintos ítems que forman parte de los criterios de Kasukawa, los pacientes con EMTC seropositiva tienen un aumento significativo de adenopatías, eritema malar, leucopenia, debilidad muscular y aumento de enzimas musculares (tabla 9).

Criterios de Kasukawa	EMTC seropositiva (n=70)		EMTC seronegativa (n=75)				IC 95% OR	
	n	%	n	%	p	OR	Inferior	Superior
Fenómeno de Raynaud	70	100%	69	92%	0,046	-		
Manos edematosas	31	44%	39	52%	0,117	1,786	0,924	3,450
Poliartritis	55	79%	8	77%	0,237	1,758	0,786	3,932
Adenopatías	28	40%	17	23%	0,038	2,275	1,105	4,681
Eritema malar	25	36%	8	11%	0,001	4,653	1,928	11,231
Pleuritis	12	17%	16	21%	0,404	1,556	0,677	3,575
Pericarditis	11	15%	12	16%	0,857	1,204	0,493	2,937
Leucopenia	41	59%	17	23%	<0,01	4,824	2,348	9,909
Trombopenia	7	10%	10	13%	0,715	0,722	0,259	2,015
Esclerodactilia	29	41%	28	37%	0,738	1,187	0,609	2,314
EPI	36	64%	40	63%	1	1,035	0,489	2,190
Hipomotilidad esofágica	24	34%	29	39%	0,708	0,828	0,420	1,630
Debilidad muscular	32	50%	24	32%	0,042	2,125	1,083	4,171
Aumento de enzimas musculares	45	64%	35	47%	0,049	2,057	1,056	4,008

EMTC: Enfermedad mixta de tejido conectivo, EPI: enfermedad pulmonar intersticial

Tabla 9. EMTC seropositiva vs seronegativa con criterios de Kasukawa

b- EMTC seropositiva vs seronegativa con criterios de Alarcón-Segovia

No se observaron diferencias significativas en la edad al inicio de la enfermedad y edad el momento del diagnóstico. El tiempo de evolución fue algo mayor en el grupo seronegativo (Tabla 10).

	EMTC seropositiva n=62		EMTC seronegativa n=54		
	mediana	DS	mediana	DS	p
Edad inicio enfermedad	36	18,0	32	17,1	0,255
Edad diagnóstico	51	18,2	51	16,9	0,987
Tiempo de evolución	14	9,4	19	9,9	0,037

DS: desviación estándar, EMTC: Enfermedad mixta de tejido conectivo

Tabla 10. Comparación características basales entre pacientes seropositivos y seronegativos usando los criterios de Alarcón-Segovia.

Cuando se compararon a los pacientes por la presencia de los distintos ítems que forman parte de los criterios de Alarcón-Segovia, los pacientes con EMTC seropositiva presentaban un aumento significativo de miositis (Tabla 11).

Criterios de Alarcón	EMTC seropositiva n=62		EMTC seronegativa n=54				IC 95% OR	
	n	%	n	%	p	OR	Inferior	Superior
Fenómeno de Raynaud	62	100%	51	94%	0,196	-		
Manos edematosas	40	65%	29	54%	0,320	1,567	0,743	3,305
Esclerodactilia	26	42%	25	46%	0,776	0,838	0,402	1,748
Artritis	56	90%	46	85%	0,574	1,573	0,336	7,366
Miositis	49	79%	29	53%	0,007	3,249	1,442	7,322

EMTC: Enfermedad mixta de tejido conectivo

Tabla 11. EMTC seropositiva vs seronegativa con criterios de Alarcón-Segovia

EMTC seropositiva y EMTC seronegativa vs pacientes sin EMTC

En la segunda fase del estudio se compararon un grupo de casos con EMTC seropositiva con un grupo de casos sin EMTC y un grupo de casos con EMTC seronegativa con un grupo de casos sin EMTC.

a- EMTC seropositiva vs casos sin EMTC

Con respecto a los pacientes sin EMTC, los pacientes con EMTC seropositiva según los criterios de Kasukawa o los de Alarcón-Segovia presentaron un aumento significativo de ESC, ESC difusa, PDM, artritis, manos edematosas, esclerodactilia, telangiectasias, fenómeno de Raynaud, hipomotilidad esofágica, manifestaciones pulmonares, manifestaciones musculares (mialgias, debilidad muscular, aumento de enzimas musculares), adenopatías y FR. Lógicamente, este grupo presenta un aumento significativo de la frecuencia de anticuerpos anti-U1-RNP, tanto por *immunoblotting* como por ELISA. Hasta un 20% de los pacientes sin EMTC tenía anticuerpos anti-U1-RNP (Tablas 12 y 13).

La tabla 14 a continuación muestra una versión simplificada y comparativa de las tablas 12 y 13, en donde las variables que están relacionadas con presentar EMTC seropositiva presentan un asterisco (*) en la columna correspondiente a los criterios de clasificación.

	EMTC seropositiva		No EMTC					
	n	%	n	%	p	OR	IC 95% OR	
ESC	24	34%	62	11%	<0,001	4,08	2,33	7,14
ESC difusa	13	19%	27	5%	<0,001	4,39	2,15	8,99
PDM	25	36%	84	15%	<0,001	3,06	1,78	5,26
Artritis	58	83%	302	55%	<0,001	3,92	2,06	7,47
Edema de manos	39	56%	38	7%	<0,001	16,85	9,48	29,96
Esclerodactilia	29	41%	39	7%	<0,001	9,21	5,18	16,40
Telangiectasias	31	44%	77	14%	<0,001	4,85	2,86	8,24
Raynaud	70	100%	151	28%	<0,001	No calculable		
Hipomotilidad esofágica	24	34%	43	8%	<0,001	6,12	3,41	10,96
Manifestaciones pulmonares	42	60%	173	32%	<0,001	3,24	1,95	5,41
Manifestaciones musculares	50	71%	132	24%	<0,001	7,86	4,52	13,68
Mialgias	32	46%	101	18%	<0,001	3,72	2,22	6,24
Debilidad	35	50%	92	17%	<0,001	4,95	2,94	8,31
Aumento enzimas musculares	45	64%	97	18%	<0,001	8,35	4,89	14,27
Adenopatías	28	40%	93	17%	<0,001	3,25	1,92	5,52
FR	38	54%	167	31%	<0,001	2,70	1,63	4,47
anti-U1-RNP (IB)	55	86%	74	20%	<0,001	25,02	11,83	52,93
anti-U1-RNP-70 kd	36	56%	29	8%	<0,001	15,25	8,18	28,42
anti-U1-RNP-A	50	78%	55	15%	<0,001	20,65	10,69	39,88
anti-U1-RNP-C	38	59%	54	14%	<0,001	8,63	4,85	15,36
anti-U1-RNP (ELISA)	69	99%	104	19%	<0,001	290,60	39,90	2116,66

EMTC: Enfermedad mixta de tejido conectivo; ESC: esclerosis sistémica cutánea; PDM: poli-dermatomiositis; FR: factor reumatoide; IB: *immunoblotting*; ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*

Tabla 12. Variables relacionadas con presentar EMTC seropositiva según criterios de Kasukawa

	EMTC seropositiva		No EMTC					
	n	%	n	%	p	OR	IC 95% OR	
ESC	24	39%	74	13%	<0,001	4,284	2,432	7,548
PDM	24	39%	89	15%	<0,001	3,456	1,977	6,043
Artritis	56	90%	313	54%	<0,001	7,842	3,326	18,491
Edema de manos	40	65%	39	7%	<0,001	25,035	13,556	46,234
Esclerodermia difusa	14	23%	35	6%	<0,001	4,508	2,269	8,957
Esclerodactilia	26	42%	45	8%	<0,001	8,522	4,728	15,360
Telangiectacias	27	44%	93	16%	<0,001	4,006	2,314	6,937
Fenómeno de Raynaud	62	100%	177	31%	<0,001	No calculable		
Hipomotilidad esofágica	22	35%	51	9%	<0,001	5,662	3,125	10,259
Manifestaciones musculares	49	79%	142	25%	<0,001	11,520	6,073	21,851
Mialgias	31	50%	107	19%	<0,001	4,383	2,554	7,524
Debilidad	34	55%	97	17%	<0,001	5,996	3,474	10,349
Aumento de enzimas musculares	44	71%	105	18%	<0,001	10,965	6,092	19,737
Adenopatías	25	40%	101	18%	<0,001	3,178	1,832	5,513
FR	35	56%	174	30%	<0,001	2,995	1,758	5,101
anti-U1-RNP (IB)	50	88%	78	19%	<0,001	29,853	13,035	68,370
anti-U1-RNP-70 kd	33	58%	32	8%	<0,001	15,813	8,355	29,926
anti-U1-RNP-A	45	79%	59	15%	<0,001	21,674	10,826	43,392
anti-U1-RNP-C	36	63%	55	14%	<0,001	10,753	5,850	19,766
anti-U1-RNP (ELISA)	60	97%	113	20%	<0,001	121,593	29,280	504,947

EMTC: Enfermedad mixta de tejido conectivo; FR: factor reumatoide; IB: *immunoblotting*; ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*

Tabla 13. Variables relacionadas con EMTC seropositiva según criterios de Alarcón-Segovia

	Kasukawa	Alarcón-Segovia
ESC	*	*
ESC difusa	*	*
PDM	*	*
Artritis	*	*
Edema de manos	*	*
Esclerodactilia	*	*
Telangectacias	*	*
Fenómeno de Raynaud	*	*
Hipomotilidad esofágica	*	*
Manifestaciones pulmonares	*	
Manifestaciones musculares	*	*
Mialgias	*	*
Debilidad	*	*
Aumento de enzimas musculares	*	*
Adenopatías	*	*
FR	*	*
anti-U1-RNP (IB)	*	*
anti-U1-RNP-70 kd	*	*
anti-U1-RNP-A	*	*
anti-U1-RNP-C	*	*
anti-U1-RNP (ELISA)	*	*

EMTC: Enfermedad mixta de tejido conectivo; ESC: esclerosis sistémica cutánea; PDM: poli-dermatomiositis; FR: factor reumatoide; IB: inmunoblotting; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

Tabla 14. Variables relacionadas con EMTC seropositiva (vs pacientes sin EMTC)

b- EMTC seronegativa vs casos sin EMTC

Con respecto a los pacientes sin EMTC, los pacientes con EMTC seronegativa presentaban un aumento significativo de ESC, ESC difusa, so-ERAS, manos edematosas, microstomía, esclerodactilia, telangiectasias, calcinosis, úlceras digitales, fenómeno de Raynaud, hipomotilidad esofágica, manifestaciones pulmonares (fibrosis pulmonar), miocarditis, arritmias, manifestaciones musculares (aumento de enzimas musculares), ANA con patrón nucleolar y anticuerpos anti-topoisomerasa-1/Scl70. Los pacientes sin EMTC presentaban un aumento significativo de eritema malar y anticuerpos anti-DNA (tablas 15 y 16).

La tabla 17 a continuación muestra una versión simplificada y comparativa de las tablas 15 y 16, en donde las variables que están relacionadas con presentar EMTC seronegativa presentan un asterisco (*) en la columna correspondiente a los criterios de clasificación.

	EMTC seronegativa		No EMTC					
	n	%	n	%	p	OR	IC 95% OR	
LES	19	26%	417	76%	<0,001	0,108	0,062	0,188
ESC	45	61%	62	11%	<0,001	12,138	7,099	20,755
ESC difusa	23	31%	27	5%	<0,001	8,519	4,560	15,914
Solapamiento	15	20%	37	7%	<0,001	3,504	1,815	6,765
Eritema malar	8	11%	183	33%	<0,001	0,238	0,112	0,505
Edema de manos	31	41%	38	7%	<0,001	9,437	5,361	16,614
Microstomía	16	21%	18	3%	<0,001	7,970	3,859	16,458
Esclerodactilia	28	37%	39	7%	<0,001	7,760	4,388	13,723
Telangiectasias	41	55%	77	14%	<0,001	7,361	4,400	12,313
Calcinosis	15	20%	16	3%	<0,001	8,297	3,906	17,622
Úlceras digitales	37	49%	60	11%	<0,001	7,903	4,670	13,375
Fenómeno de Raynaud	69	92%	151	28%	<0,001	30,159	12,826	70,916
Hipomotilidad esofágica	29	39%	43	8%	<0,001	7,389	4,223	12,928
Manifestaciones pulmonares	50	67%	173	32%	<0,001	4,324	2,589	7,220
Fibrosis pulmonar	31	41%	38	7%	<0,001	9,437	5,361	16,614
Miocarditis	7	9%	7	1%	<0,001	7,941	2,703	23,328
Arritmias	17	23%	43	8%	<0,001	3,435	1,841	6,411
Manifestaciones musculares	38	51%	132	24%	<0,001	3,229	1,972	5,288
Aumento enzimas musculares	35	47%	97	18%	<0,001	4,059	2,452	6,719
ANA patrón nucleolar	22	29%	50	9%	<0,001	4,126	2,320	7,339
Anti-DNA	14	20%	326	61%	<0,001	0,159	0,086	0,292
Anti-Scl 70	15	21%	15	4%	<0,001	6,702	3,110	14,444

EMTC: Enfermedad mixta de tejido conectivo; LES: lupus eritematoso sistémico; ESC: esclerosis sistémica cutánea; ANA: anticuerpos antinucleares; DNA: ácido desoxiribonucleico

Tabla 15. Variables relacionadas con EMTC seronegativa según criterios de Kasukawa

	EMTC seronegativa		No EMTC					
	n	%	n	%	p	OR	IC 95% OR	
LES	13	25%	429	74%	<0,001	0,111	0,058	0,214
ESC	33	62%	74	13%	<0,001	11,193	6,102	20,532
ESC difusa	14	26%	35	6%	<0,001	5,410	2,692	10,873
Solapamiento	12	23%	40	7%	<0,001	3,922	1,911	8,050
Artritis	46	85%	313	54%	<0,001	4,831	2,240	10,419
Edema de manos	29	54%	39	7%	<0,001	15,972	8,542	29,868
Microstomía	13	24%	21	4%	<0,001	8,380	3,915	17,935
Esclerodactilia	25	46%	45	8%	<0,001	10,172	5,497	18,823
Telangiectasias	29	54%	93	16%	<0,001	6,025	3,376	10,751
Calcinosis	11	20%	20	3%	<0,001	7,112	3,200	15,803
Úlceras digitales	26	48%	72	13%	<0,001	6,500	3,610	11,704
Fenómeno de Raynaud	51	94%	177	31%	<0,001	38,322	11,802	124,436
Hipomotilidad esofágica	23	43%	51	9%	<0,001	7,638	4,145	14,073
Fibrosis pulmonar	20	37%	54	9%	<0,001	5,686	3,061	10,563
Manifestaciones musculares	29	54%	142	25%	<0,001	3,545	2,010	6,253
Aumento de enzimas musculares	28	52%	105	18%	<0,001	4,831	2,721	8,578
Manifestaciones hematológicas	24	44%	407	71%	<0,001	0,332	0,189	0,585
ANA patrón nucleolar	17	31%	55	10%	<0,001	4,352	2,300	8,237
Anti-DNA	10	20%	334	59%	<0,001	0,175	0,086	0,358

EMTC: Enfermedad mixta de tejido conectivo; LES: lupus eritematoso sistémico; ESC: esclerosis sistémica cutánea;
ANA: anticuerpos antinucleares; DNA: ácido deoxiribonucleico

Tabla 16. Variables relacionadas con EMTC seronegativa según criterios de Alarcón-Segovia

	Kasukawa	Alarcón-Segovia
ESC	*	*
Solapamiento	*	*
Artritis		*
Edema de manos	*	*
Esclerodermia difusa	*	*
Esclerodactilia	*	*
Telangiectasias	*	*
Fenómeno de Raynaud	*	*
Hipomotilidad esofágica	*	*
Microstomía	*	*
Calcinosis	*	*
Úlceras digitales	*	*
Manifestaciones pulmonares	*	
Fibrosis pulmonar	*	*
Manifestaciones musculares	*	*
Aumento enzimas musculares	*	*
Eritema malar	*	
Miocarditis	*	
Arritmias	*	
ANA patrón nucleolar	*	*
Anti-Scl 70	*	

EMTC: Enfermedad mixta de tejido conectivo; LES: lupus eritematoso sistémico, ESC: esclerosis sistémica cutánea, ANA: anticuerpos antinucleares, ADN: ácido deoxiribonucleico

Tabla 17. Variables que están relacionadas con presentar EMTC seronegativa cuando se compara a los pacientes con EMTC seronegativa vs pacientes sin EMTC

En resumen, tanto en la EMTC seropositiva como en la EMTC seronegativa, se encontró una asociación estadísticamente significativa con manifestaciones de ESC (ESC difusa, esclerodactilia, manos edematosas, telangiectasias, fenómeno de Raynaud, hipomotilidad esofágica, manifestaciones pulmonares), artritis, miocarditis y miositis al compararlos con la población total de pacientes sin EMTC. El grupo de pacientes sin EMTC se asociaba significativamente con la detección de anticuerpos anti-ADN y manifestaciones típicas de LES (eritema malar y citopenias).

Modelos para predecir o explicar la ausencia de anti-U1-RNP

En la tercera fase del estudio se ajustaron varios modelos de regresión logística binaria para predecir o explicar la presencia del anticuerpo anti-U1-RNP a partir de un conjunto de variables predictoras cuya importancia se valoró secuencialmente por bloques. Se buscaron las variables asociadas significativamente con la ausencia de anticuerpos anti-U1-RNP (EMTC seronegativa) en personas que cumplieran con los criterios clínicos de EMTC. Es decir, para todas las personas con los criterios clínicos, comparamos las que son seronegativas (sin anticuerpos anti-U1-RNP) con las que son seropositivas (con anticuerpos anti-U1-RNP) y vemos que otras variables se asocian al hecho de ser seronegativo. Los modelos de regresión logística binaria para predecir o explicar la ausencia de anticuerpos anti-U1-RNP son los siguientes:

a) EMTC seronegativa (Kasukawa): Modelo de regresión logística binaria 1

Como variables independientes se propusieron el diagnóstico de LES, las manifestaciones hematológicas, la leucopenia y la detección de anticuerpos anti-Sm, todas ellas variables dicotómicas. Las variables con *odds ratio* <1 son factores que

aumentan la probabilidad de presentar anticuerpos anti-U1-RNP en esta muestra. Por tanto, el diagnóstico de LES (OR=0,288), la leucopenia (OR=0,348) y los anticuerpos anti-Sm (OR=0,078) aumentaban la probabilidad de presentar anticuerpos anti-URNP y no se relacionan con la EMTC seronegativa (tabla 18).

(n=145)	p	Odds Ratio	IC 95% para OR	
			Inferior	Superior
anti-Sm	0,019	0,079	0,010	0,655
LES	0,004	0,288	0,125	0,665
Leucopenia	0,013	0,348	0,151	0,799

Tabla 18 Modelo de regresión logística con EMTC seronegativa según criterios de Kasukawa como variable dependiente

b) EMTC seronegativa (Kasukawa): Modelo de regresión logística binaria 2

Para este modelo se usaron sólo los casos con criterios clínicos de Kasukawa para el diagnóstico de EMTC (n=145). Vemos qué variables se asocian significativamente con la ausencia de anticuerpos anti-U1-RNP en la población de personas que cumplían con los criterios de Kasukawa (tabla 19).

n = 143	p	Odds Ratio	IC 95% para OR	
			Inferior	Superior
LES	0,000	0,204	0,088	0,472
FR	0,010	0,324	0,138	0,759
Úlceras digitales	0,048	2,503	1,007	6,226
ANA nucleolar	0,028	3,748	1,157	12,140

Tabla 19. Modelo de regresión logística con EMTC seronegativa según criterios de Kasukawa como variable dependiente

Las variables LES y FR tienen *odds ratio* <1 por lo que su presencia aumentaba la probabilidad de presentar anticuerpos anti-U1-RNP en esta muestra. Las variables con *odds ratio* >1 son factores que disminuyen la probabilidad de presentar anticuerpos anti-U1-RNP. Por tanto, el desarrollo de úlceras digitales (OR=2.508) y la detección de ANA con patrón nucleolar (OR=3.748) se relacionaban con EMTC seronegativa, disminuyendo la probabilidad de presentar anticuerpos anti-U1-RNP. Este modelo consigue clasificar correctamente el 73.4% de los casos (75.4% de especificidad, 71.6% de sensibilidad).

c) EMTC seronegativa (Alarcón-Segovia): Modelo de regresión logística binaria 3

Para este modelo se usan sólo los casos que cumplen con los criterios de Alarcón-Segovia para el diagnóstico de EMTC (n = 116). Ahora estudiamos qué variables se asocian significativamente con la presencia de anticuerpos anti-U1-RNP en la población de personas que cumplen con los criterios de Alarcón-Segovia para EMTC. Es decir, para todas las personas que cumplen con los criterios, comparamos las que son seronegativas con las que no y vemos que otras variables se asocian al hecho de ser seronegativo. Todas las variables son categóricas.

Las variables con una odds ratio <1 son factores cuya presencia aumenta la probabilidad de presentar anticuerpos anti-U1-RNP en esta muestra. Cuando la variable dependiente o criterio de la regresión es EMTC seronegativa según criterios de Alarcón-Segovia, el diagnóstico de LES (OR=0,000) y la leucopenia (OR=0,045) aumentaban la probabilidad de presentar anticuerpos anti-URNP y no se relacionan con la EMTC seronegativa (tabla 20).

(n=116)	p	Odds Ratio	IC 95% para OR	
			Inferior	Superior
LES	0,000	0,154	0,060	0,396
Leucopenia	0,045	0,357	0,130	0,977

Tabla 20. Modelo de regresión logística con EMTC seronegativa según criterios de Alarcón-Segovia como variable dependiente

d) EMTC seronegativa (Alarcón-Segovia): Modelo de regresión logística binaria 4

Las variables con una odds ratio <1 son factores cuya presencia aumenta la probabilidad de presentar anticuerpos anti-U1-RNP en esta muestra. Esta variable fue el diagnóstico de LES (OR=0,097). Las variables con una odds ratio >1 son factores que disminuyen la probabilidad de presentar anticuerpos anti-U1-RNP. Estas variables fueron ANA patrón nucleolar (OR=4,081) y el sexo femenino (OR = 13,319) (tabla 21). Este modelo consigue clasificar correctamente el 74.6% de los casos (78.7% de especificidad, 69.8% de sensibilidad).

n = 114	p	Odds Ratio	IC 95% para OR	
			Inferior	Superior
LES	0,000	0,097	0,037	0,253
Mujer	0,008	13,319	1,973	89,906
ANA nucleolar	0,032	4,081	1,132	14,710

Tabla 21. Modelo de regresión logística con EMTC seronegativa según criterios de Alarcón-Segovia como variable dependiente

Este modelo consigue clasificar correctamente el 74.6% de los casos (78.7% de especificidad, 69.8% de sensibilidad).

e) Anticuerpos anti-U1-RNP en población total: Modelo de regresión logística binaria

5

Se estudian las variables asociadas a la presencia de anticuerpos anti-RNP detectados por ELISA en la población total. Las variables categóricas con una *odds ratio* >1 son factores que aumentan la probabilidad de presentar anticuerpos anti-U1-RNP. Estas variables fueron el diagnóstico de LES (OR=5,192), la artritis (OR=1,955), el fenómeno de Raynaud (OR=3,075), la rigidez matutina (OR=1,669) y la esclerodactilia (OR=2,273). La variable so-ERAS tiene una *odds ratio* <1 (OR=0,383) por lo que en estos pacientes la probabilidad de presentar anticuerpos anti-U1-RNP estaba disminuida (tabla 22).

n = 682	p	Odds Ratio	IC 95% para OR	
			Inferior	Superior
LES	0,000	5,192	2,763	9,757
so-ERAS	0,020	0,383	0,171	0,860
Artritis	0,004	1,955	1,237	3,090
Fenómeno de Raynaud	0,000	3,075	2,016	4,691
Rigidez	0,030	1,669	1,049	2,654
Esclerodactilia	0,020	2,273	1,140	4,532

LES: lupus eritematoso sistémico, so-ERAS: solapamiento de enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas

Tabla 22. Modelo de regresión logística con anticuerpos anti-U1-RNP detectados por ELISA en la población total como variable dependiente

Este modelo consigue clasificar correctamente el 78.2% de los casos (93.9% de especificidad, 31.8% de sensibilidad).

f) Anticuerpos anti-U1-RNP en pacientes con criterios clínicos de EMTC (seropositivos más seronegativos) según los criterios de Kasukawa: Modelo de regresión logística binaria 6

Para este modelo se usan todos los casos que cumplen con los criterios de Kasukawa para el diagnóstico de EMTC ($n = 143$), sean seropositivos o seronegativos. Se estudian las variables independientes asociadas a la presencia de anticuerpos anti-U1-RNP en los pacientes con criterios clínicos de EMTC seropositiva más seronegativa según los criterios de Kasukawa. La variable dependiente o criterio de la regresión son los anticuerpos anti-U1-RNP en pacientes que cumplen los criterios de

Kasukawa para EMTC, sean seropositivos (con anti-U1-RNP) o seronegativos (sin anti-U1-RNP) (tabla 23).

n = 143	p	Odds Ratio	IC 95% para OR	
			Inferior	Superior
LES	0,000	5,850	2,412	14,189
FR	0,016	2,937	1,218	7,083
Úlceras digitales	0,049	0,393	0,155	0,995
Miocarditis	0,058	0,205	0,040	1,054
ANA nucleolar	0,007	0,169	0,047	0,615

LES: lupus eritematoso sistémico, FR: factor reumatoide, ANA: anticuerpos antinucleares

Tabla 23 Modelo de regresión logística con anticuerpos anti-U1-RNP en pacientes con EMTC seropositiva y seronegativa con criterios de Kasukawa como variable dependiente

El diagnóstico de LES (OR=5,850) y el FR (OR=2,937) tienen una *odds ratio* >1 y aumentaban la probabilidad de presentar anticuerpos anti-U1-RNP. Las variables con una *odds ratio* <1 disminuyen la probabilidad de presentar anticuerpo anti-U1-RNP en esta muestra. Estas variables fueron las úlceras digitales (OR=0,393), la miocarditis (OR=0,205) y los ANA con patrón nucleolar (OR=0,169).

Este modelo consigue clasificar correctamente el 76.2% de los casos (78.4% de especificidad, 73.9% de sensibilidad).

g) Anticuerpos anti-U1-RNP en pacientes con criterios clínicos de EMTC (seropositivos más seronegativos) según los criterios de Alarcón-Segovia: Modelo de regresión logística binaria 7

Para este modelo se usan todos los casos que cumplen con los criterios de Alarcón-Segovia para el diagnóstico de EMTC ($n = 114$), sean seropositivos o seronegativos. Estudiamos qué variables se asocian significativamente con la presencia de anticuerpos anti-U1-RNP en pacientes que cumplen con los criterios de Alarcón-Segovia para EMTC, tengan o no anticuerpos anti-U1-RNP (seropositivos más seronegativos). Todas las variables son categóricas (Tabla 24). Las variables con una *odds ratio* >1 son factores que aumentan la probabilidad de presentar anticuerpos anti-U1-RNP. Estas variables fueron diagnóstico de LES (OR = 4,283) y FR (OR = 3,367). Las variables con una *odds ratio* <1 son factores cuya presencia disminuye la probabilidad de presentar anticuerpos anti-U1-RNP en esta muestra. Estas variables son fibrosis pulmonar (OR=0,162), úlceras digitales (OR=0,318) y ANA patrón nucleolar (OR=0,030).

n = 114	p	Odds Ratio	IC 95% para OR	
			Inferior	Superior
LES	0,005	4,283	1,549	11,839
Fibrosis pulmonar	0,012	0,162	0,039	0,670
FR	0,024	3,367	1,170	9,691
Úlceras digitales	0,037	0,318	0,108	0,936
ANA patrón nucleolar	0,012	0,141	0,030	0,652

LES: lupus eritematoso sistémico, FR: factor reumatoide, ANA: anticuerpos antinucleares

Tabla 24. Modelo de regresión logística con anticuerpos anti-U1-RNP en pacientes con EMTC seropositiva y seronegativa con criterios de Alarcón-Segovia como variable dependiente

Este modelo consigue clasificar correctamente el 79.8% de los casos (83.3% de especificidad, 76.7% de sensibilidad).

h) Anticuerpos anti-U1-RNP en pacientes con criterios de LES: Modelo de regresión logística binaria 8

Para este modelo se usan todos los casos que tienen diagnosticado LES ($n=481$). Todas las variables son categóricas. Las variables ESC (OR=3.665), PDM (OR=23.853), artritis (OR=1.695), fenómeno de Raynaud (OR=2.362), rigidez matutina (OR=1.954) y úlceras digitales (OR=2.441) son factores que aumentaban la probabilidad de presentar anticuerpos anti-U1-RNP. Los so-ERAS disminuían la probabilidad de presentar anticuerpos anti-U1-RNP (OR=0,064) (tabla 25).

n = 114	p	Odds Ratio	IC 95% para OR	
			Inferior	Superior
ESC	0,157	3,665	0,606	22,173
PDM	0,000	23,853	4,658	122,136
Solapamiento	0,001	0,064	0,013	0,305
Artritis	0,046	1,695	1,008	2,851
Fenómeno de Raynaud	0,000	2,362	1,490	3,746
Rigidez	0,015	1,954	1,141	3,347
Úlceras digitales	0,043	2,441	1,030	5,782

ESC: esclerosis sistémica cutánea, PDM: poli-dermatomiositis

Tabla 25. Modelo de regresión logística con anticuerpos anti-U1-RNP detectados por ELISA en pacientes con LES como variable dependiente

Este modelo consigue clasificar correctamente el 74.6% de los casos (94.2% de especificidad, 31.8% de sensibilidad).

DISCUSIÓN

La EMTC es una ERAS caracterizada por el desarrollo simultáneo o secuencial de manifestaciones clínicas de LES, ESC y PDM, asociadas a la detección a títulos elevados de anticuerpos anti-U1-RNP en el suero de los pacientes (5,49). En el campo de la reumatología el concepto de EMTC ha sido muy debatido a lo largo de los años (82,83). Hay quienes sostienen que es en realidad un so-ERAS o una fase indiferenciada y temprana de otra enfermedad reumatológica, de hecho, la EMTC tiende a evolucionar de una fase inflamatoria a una fase esclerótica en la mayoría de los pacientes (54). No obstante, el concepto de EMTC como entidad definida se asienta en la existencia de un patrón clínico determinado, un anticuerpo característico (anti-U1-RNP) y unos hallazgos inmunológicos y genéticos específicos (82) como en LES u otras ERAS definidas.

La descripción original de Sharp (5), una condición benigna con buena respuesta a corticoides y anticuerpos anti-RNP, no se ha sostenido a través del tiempo, ya que desde luego no es una entidad benigna y algunos pacientes tienen las características clínicas sin los anticuerpos, y viceversa. Las principales entidades consideradas “bien definidas” según los criterios de clasificación establecidos pueden ser extremadamente heterogéneas y tener un amplio espectro de características clínicas. Un paciente puede ser clasificado como AR sin detectarse FR o ACPA, de LES sin anticuerpos anti-ADN ni anti-Sm, ESC sin anticuerpos relacionados (anti-topoisomerasa 1, anticentrómero, anti-RNA polimerasa III), PDM sin anticuerpos específicos de miositis (antisintetasas), SSP sin anticuerpos anti-Ro/SS-A o anti-La/SS-B, so-ERAS (PDM, ESC) sin anticuerpos anti-PM/Scl o poliangeítis sin ANCA. Recientemente, se han descrito SAF sin anticuerpos antifosfolípido (89). Ya existen, aunque escasas, descripciones en la literatura y la percepción de que la EMTC no siempre es una enfermedad seropositiva (83,99,100).

Este trabajo es el primero en comparar pacientes con EMTC (EMTC seropositiva, criterios clínicos con anti-U1-RNP positivo) y pacientes con ERAS que clínicamente se manifiestan como EMTC pero no presentan anticuerpos anti-U1-RNP (EMTC seronegativa, criterios clínicos sin anti-U1-RNP). Algunos pacientes de esta cohorte tenían manifestaciones de ERAS y cumplían criterios clínicos de EMTC en ausencia de anticuerpos anti-U1-RNP, desde el inicio de la enfermedad y a lo largo de su evolución, tanto si se utilizan los criterios de clasificación de Kasukawa como los propuestos por Alarcón-Segovia. La EMTC seronegativa fue más frecuente en la cohorte que los diagnósticos de so-ERAS o vasculitis sistémicas y la frecuencia es similar a la observada en el caso de la EMTC seropositiva.

La EMTC seronegativa era similar a la EMTC seropositiva en sus características demográficas, con una edad de diagnóstico comparable a la descrita por Ungprasert *et al.* en la población de Olmsted County, Minnesota (48,1 años) (9) y algo mayor que la de Gunnarsson *et al.* en Noruega (37,9 años) (10). Los pacientes con EMTC seropositiva presentaron más fenómeno de Raynaud y más manifestaciones de LES (adenopatías, eritema malar y leucopenia) y PDM (debilidad muscular, aumento de enzimas musculares) que los pacientes con EMTC seronegativa. En cambio, los pacientes con EMTC seronegativa tenían más diagnósticos de ESC y so-ERAS.

En ambos grupos, EMTC seropositiva y EMTC seronegativa, se encontró una asociación estadísticamente significativa con artritis, variables relacionadas con ESC (esclerodactilia, manos edematosas, telangiectasias, microstomía, calcinosis, úlceras digitales fenómeno de Raynaud, hipomotilidad esofágica, manifestaciones

pulmonares), PDM (debilidad muscular, aumento de enzimas musculares) y so-ERAS con respecto a los pacientes con ERAS sin EMTC.

Los pacientes con EMTC seropositiva mostraron además una mayor asociación con adenopatías y FR; los pacientes con EMTC seronegativa tenían más miocarditis, citopenias, ANA con patrón nucleolar y anticuerpos anti-Scl-70 (anti-topoisomerasa I). Los pacientes con ERAS no-EMTC tenían un aumento significativo de manifestaciones de LES (eritema malar, citopenias, anticuerpos anti-ADN) al compararlos con los pacientes con EMTC seronegativa. En resumen, los pacientes con EMTC seronegativa tenían más manifestaciones de ESC y menos manifestaciones de LES y PDM que los pacientes con EMTC seropositiva. Cuando comparamos con el grupo de ERAS sin EMTC, tanto la EMTC seronegativa como la EMTC seropositiva presentaban más artritis, manifestaciones de ESC y manifestaciones de PDM.

La coexistencia del anti-U1-RNP con otros autoanticuerpos es un hallazgo común en pacientes con EMTC y tiene una influencia significativa en la expresión de la enfermedad (28). Los síntomas clínicos y la presencia de un verdadero “solapamiento” de autoanticuerpos sugieren que muchos de los factores inmunológicos que intervienen en el desarrollo de ERAS definidas pueden participar en la patogenia de la EMTC. Estos factores contribuyen a la activación del sistema inmunológico a través de la señalización innata vía TLR y otros receptores del sistema inmune innato, la modificación del antígeno RNP y sus ARN asociados, la hiperactivación de células B, la activación anormal de células T y defectos en el aclaramiento de las células apoptóticas y complejos inmunes (101).

Aunque la detección de anticuerpos anti-U1-RNP forma parte de los criterios diagnósticos para la EMTC, esto no implica que desempeñen necesariamente un papel determinante en el desarrollo de la enfermedad. La presencia de anticuerpos anti-U1-RNP y de los distintos anti-ENA a lo largo de la evolución de los pacientes no siempre se mantiene y las concentraciones de anticuerpos pueden fluctuar e incluso los anticuerpos anti-U1-RNP pueden desaparecer (102). Cappelli et al. describen en su cohorte multicéntrica retrospectiva una positividad para el anti-U1-RNP en el momento del diagnóstico de 100% frente a 91% con una duración media de la enfermedad de $7,9 \pm 5,9$ (54), lo cual implica que determinados pacientes diagnosticados de EMTC han sido seronegativos en algún momento de su evolución.

Por otra parte, los anticuerpos anti-U1-RNP no son específicos de la EMTC pudiendo aparecer en pacientes con LES, otras ERAS definidas o, incluso, ningún diagnóstico concreto. Según se ha descrito, entre un 20-40% de pacientes con LES, 2-14% de pacientes con ESC y 6-9% de pacientes con PDM presentan anticuerpos anti-U1-RNP (54,103,104). En esta cohorte, un 20% de los pacientes sin EMTC presentaban anticuerpos anti-U1-RNP.

Queda por establecer la relevancia de los antígenos U1-RNP para romper la tolerancia y generar la respuesta autoinmune en el que se ha basado el desarrollo de la EMTC y si las respuestas inmunes al U1-RNP median las formas de lesión tisular que se observan en la enfermedad (39). También está por establecer la relación entre el anticuerpo y la actividad de la enfermedad, ya que se ha sugerido que su desaparición implica remisión en ciertos pacientes (105) y que los títulos de anti-U1RNA estarían en relación con la actividad de la enfermedad en pacientes con LES y so-ERAS (106).

En esta cohorte, la probabilidad de tener anticuerpos anti-U1-RNP aumentaba de manera significativa en pacientes con artritis, FR y manifestaciones de LES (leucopenia y anticuerpos anti-Sm), ESC (fenómeno de Raynaud y esclerodactilia) o PDM. Es conocida la relación entre EMTC y LES (100,107,108), de hecho, si aceptamos la EMTC como una entidad que por definición abarca manifestaciones de LES y esclerodermia, estos hallazgos son incluso esperables. La asociación entre el fenómeno de Raynaud y el RNP también se ha descrito en la literatura (109). Furtado *et al.* describen en pacientes con LES una asociación significativa de las alteraciones en la capilaroscopia con el fenómeno de Raynaud y el anticuerpo anti-U1-RNP (110). En este estudio, se halló una asociación inversa entre la probabilidad de tener anticuerpos anti-U1-RNP en pacientes con so-ERAS, miocarditis y manifestaciones de ESC (úlceras digitales, fibrosis pulmonar, ANA patrón nucleolar).

Si bien el concepto de EMTC parece clínicamente útil, ya que identifica un grupo de pacientes en los que puede haber manifestaciones potencialmente graves y en los últimos años han aumentado nuestros conocimientos clínicos y epidemiológicos de la EMTC (9,10,21,28), aún es necesario unificar y probablemente replantear los criterios de clasificación de la enfermedad. En la EMTC no se han realizado estudios extensos probablemente debido a: (1) las controversias sobre el concepto que pueden haber empañado el entusiasmo de algunos investigadores; (2) la aparente rareza de la enfermedad; (3) la falta de definiciones claras para separar a la EMTC de los otras ERAS; y (4) la ausencia de criterios de clasificación internacionalmente aceptados que dificulta la realización de estudios comparativos (111). También para los pacientes con una posible EMTC seronegativa será necesario realizar desarrollar estudios prospectivos que valoren la historia natural de la enfermedad, en especial los posibles biomarcadores clínicos y serológicos desde el inicio de la enfermedad y a lo largo de

su evolución. La gravedad de sus manifestaciones clínicas y la acumulación de daño orgánico sugieren que la EMTC seronegativa merece un seguimiento y tratamiento adecuado, incluso en ausencia de una clasificación formal en este momento.

Entre las fortalezas de este estudio destacan el elevado número de pacientes evaluados, su aspecto longitudinal que permite valorar las características específicas de la enfermedad a través de un período prolongado de seguimiento en un grupo de pacientes étnicamente homogéneos y la posibilidad, gracias al diseño del registro, de comparar a los pacientes no sólo con otros diagnosticados de EMTC sino con el resto de ERAS. Una de las principales limitaciones del estudio es la procedencia de los pacientes del mismo centro hospitalario terciario, sin embargo, se trata de un hospital de referencia en Madrid, representativo del espectro de ERAS que se observa en el sur de Europa (112–115). Como los pacientes fueron evaluados por diferentes médicos, se puede esperar cierta variabilidad inter-observador. Sin embargo, el proceso de recolección de datos fue estrictamente estandarizado entre los miembros del personal durante todo el período del estudio y evaluado siempre por el mismo investigador.

CONCLUSIONES

- Existen pacientes con manifestaciones clínicas características de enfermedad mixta del tejido conectivo que no presentan anticuerpos anti-U1-RNP detectables en el suero a lo largo de su evolución.

- Los pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo seropositiva presentaron más fenómeno de Raynaud y más manifestaciones de lupus eritematoso sistémico (adenopatías, eritema malar y leucopenia) y polimiositis-dermatomiositis (debilidad muscular, aumento de enzimas musculares) que los pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo seronegativa. En cambio, los pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo seronegativa tenían más diagnósticos de esclerosis sistémica cutánea y síndrome de solapamiento de enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas.

- Con respecto a los pacientes sin enfermedad mixta del tejido conectivo, los pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo seropositiva presentaban un aumento significativo de manifestaciones de artritis, esclerosis sistémica cutánea y polimiositis-dermatomiositis coherente con el perfil de enfermedad mixta del tejido conectivo clásica.

- Con respecto a los pacientes sin enfermedad mixta del tejido conectivo, los pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo seronegativa presentaron también un aumento significativo de artritis, manifestaciones de esclerosis sistémica cutánea y polimiositis-dermatomiositis (aumento de enzimas musculares, miocarditis).

- La probabilidad de tener anticuerpos anti-U1-RNP aumenta de manera significativa en pacientes con artritis, factor reumatoide, manifestaciones de lupus eritematoso sistémico (leucopenia y anticuerpos anti-Sm), esclerosis sistémica cutánea (fenómeno de Raynaud y esclerodactilia) o polimiositis-dermatomiositis.
- La probabilidad de no tener anticuerpos anti-U1-RNP aumenta de manera significativa en pacientes con síndrome de solapamiento de enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas, miocarditis, fibrosis pulmonar y anticuerpos antinucleares con patrón nucleolar.

REFERENCIAS

1. Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2011 Dec;365(22):2110–21.
2. Bijlsma W, editor. *EULAR Textbook on Rheumatic Diseases*. 2nd editio. BMJ GROUP; 2015.
3. Firestein G, Budd R, Gabriel S, McInnes I, O'Dell J. *Kelley's Textbook of Rheumatology (Ninth Edition)*. Elsevier Inc; 2013.
4. Bourn R, James JA. Pre-clinical lupus. *Curr Opin Rheumatol*. 2015 Sep;27(5):433–9.
5. Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, Gould RG, Holman HR. Mixed connective tissue disease-an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am J Med*. 1972 Feb;52(2):148–59.
6. Sharp GC, Irvin WS, May CM, Holman HR, McDuffie FC, Hess E V, et al. Association of antibodies to ribonucleoprotein and Sm antigens with mixed connective-tissue disease, systematic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *N Engl J Med*. 1976;295(21):1149–54.
7. Bennett RM, O'Connell DJ. The arthritis of mixed connective tissue disease. *Ann Rheum Dis*. 1978;37(5):397–403.
8. Bennett RM, O'Connell DJ. Mixed connective tissuse disease: a clinicopathologic study of 20 cases. *Semin Arthritis Rheum*. 1980 Aug;10(1):25–51.
9. Ungprasert P, Crowson CS, Chowdhary VR, Ernste FC, Moder KG, Matteson EL. Epidemiology of Mixed Connective Tissue Disease 1985-2014: A Population Based Study. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2016;68(12):1843–8.
10. Gunnarsson R, Molberg O, Gilboe I-M, Gran JT. The prevalence and incidence of mixed connective tissue disease: a national multicentre survey of Norwegian

- patients. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(lcd):1047–51.
11. Hoffman RW, Rettenmaier LJ, Takeda Y, Hewett JE, Pettersson I, Nyman U, et al. Human autoantibodies against the 70-kd polypeptide of U1 small nuclear RNP are associated with HLA-DR4 among connective tissue disease patients. *Arthritis Rheum*. 1990;33(5):666–73.
 12. Paradowska-Gorycka A, Stypińska B, Olesińska M, Felis-Giemza A, Mańczak M, Czuszyńska Z, et al. Association of HLA-DRB1 alleles with susceptibility to mixed connective tissue disease in Polish patients. *HLA*. 2016 Jan;87(1):13–8.
 13. Flåm ST, Gunnarsson R, Garen T, Norwegian MCTD Study Group, Lie BA MØ. The HLA profiles of mixed connective tissue disease differ distinctly from the profiles of clinically related connective tissue diseases. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2015;54(3):528–35.
 14. Barcellos LF, May SL, Ramsay PP, Quach HL, Lane JA, Nititham J, et al. High-density SNP screening of the major histocompatibility complex in systemic lupus erythematosus demonstrates strong evidence for independent susceptibility regions. *PLoS Genet*. 2009 Oct;5(10).
 15. Agarwal SK, Tan FK, Arnett FC. Genetics and Genomic Studies in Scleroderma (Systemic Sclerosis). *Rheum Dis Clin North Am*. 2008;34(1):17–40.
 16. O'Hanlon TP, Carrick DM, Arnett FC, Reveille JD, Carrington M, Gao X, et al. Immunogenetic risk and protective factors for the idiopathic inflammatory myopathies: distinct HLA-A, -B, -Cw, -DRB1 and -DQA1 allelic profiles and motifs define clinicopathologic groups in caucasians. *Medicine (Baltimore)*. 2005 Nov;84(6):338–49.
 17. Joven BE, Carreira PE. Síndrome de raynaud: Etiología y manejo. *Reumatol Clin*. 2008;4(2):59–66.
 18. Cutolo M, Sulli A, Secchi ME, Olivieri M, Pizzorni C. The contribution of

- capillaroscopy to the differential diagnosis of connective autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2007;21(6):1093–108.
19. Cutolo M, Pizzorni C, Secchi ME, Sulli A. Capillaroscopy. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008;22(6):1093–108.
 20. Cutolo, M; Matucci Cerinic M. Nailfold capillaroscopy and classification criteria for systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2007;25(5):663–5.
 21. Hajas A, Szodoray P, Nakken B, Gaal J, Zöld E, Laczik R, et al. Clinical course, prognosis, and causes of death in mixed connective tissue disease. *J Rheumatol*. 2013;40(7):1134–42.
 22. Gunnarsson R, Aalokken TM, Molberg O, Lund MB, Mynarek GK, Lexberg AS, et al. Prevalence and severity of interstitial lung disease in mixed connective tissue disease: a nationwide, cross-sectional study. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:1966–72.
 23. Ahuja J, Arora D, Kanne JP, Henry TS, Godwin JD. Imaging of Pulmonary Manifestations of Connective Tissue Diseases. *Radiol Clin North Am*. 2016;54(6):1015–31.
 24. Mira-Avendano IC, Abril A. Pulmonary manifestations of Sjögren syndrome, systemic lupus erythematosus, and mixed connective tissue disease. *Rheum Dis Clin North Am*. 2015;41(2):263–77.
 25. Ahmed S, Palevsky HI. Pulmonary Arterial Hypertension Related to Connective Tissue Disease. A Review. *Rheum Dis Clin North Am*. 2014;40(1):103–24.
 26. Hosoda Y, Suzuki Y, Takano M, Tojo T, Homma M. Mixed connective tissue disease with pulmonary hypertension: a clinical and pathological study. *J Rheumatol*. 1987 Aug;14(4):826–30.
 27. McGoon MD. The assessment of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med*. 2001 Sep;22(3):493–508, ix.

28. Szodoray P, Hajas a., Kardos L, Dezso B, Soos G, Zold E, et al. Distinct phenotypes in mixed connective tissue disease: subgroups and survival. *Lupus*. 2012;21(13):1412–22.
29. Bull TM, Fagan KA, Badesch DB. Pulmonary vascular manifestations of mixed connective tissue disease. *Rheum Dis Clin North Am*. 2005;31(3):451–64.
30. Fagundes MN, Caleiro MTC, Navarro-Rodriguez T, Baldi BG, Kavakama J, Salge JM, et al. Esophageal involvement and interstitial lung disease in mixed connective tissue disease. *Respir Med*. 2009 Jun;103(6):854–60.
31. Ortega-Hernandez OD, Shoenfeld Y. Mixed connective tissue disease: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Best Pr Res Clin Rheumatol*. 2012;26(1):61–72.
32. Hajas A, Szodoray P, Barath S, Sipka S, Rezes S, Zeher M, et al. Sensorineural hearing loss in patients with mixed connective tissue disease: immunological markers and cytokine levels. *J Rheumatol*. 2009 Sep;36(9):1930–6.
33. Nimelstein SH, Brody S, McShane D, Holman HR. Mixed connective tissue disease: a subsequent evaluation of the original 25 patients. *Medicine (Baltimore)*. 1980;59(4):239–48.
34. Pope JE. Other manifestations of mixed connective tissue disease. *Rheum Dis Clin North Am*. 2005;31(3):519–33.
35. Ruiz Pombo M, Labrador Horrillo M, Selva O'Callaghan A. Enfermedad mixta del tejido conjuntivo, conectivopatía indiferenciada y síndromes de superposición. *Med Clin (Barc)*. 2004;1123(18):712–7.
36. Hoffman RW, Greidinger EL. Mixed connective tissue disease. *Curr Opin Rheumatol*. 2000;12(5):386–90.
37. Sharp GC, Holman DH, Irvin W. EMINENCE-BASED MEDICINE MCTD: a concept which stood the test of time. *Lupus*. 2002;333–9.

38. Migliorini P, Baldini C, Rocchi V, Bombardieri S. Anti-Sm and anti-RNP antibodies. *Autoimmunity*. 2005;38(1):47–54.
39. Greidinger EL, Hoffman RW. Autoantibodies in the pathogenesis of mixed connective tissue disease. *Rheum Dis Clin North Am*. 2005;31(3):437–50.
40. Keith MP, Moratz C, Egan R, Zacharia A, Greidinger EL, Hoffman RW, et al. Anti-ribonucleoprotein antibodies mediate enhanced lung injury following mesenteric ischemia/reperfusion in Rag-1(-/-) mice. *Autoimmunity*. 2007 May;40(3):208–16.
41. Bodolay E, Csipo I, Gal I, Gyimesi E, Szekanecz Z, Szegedi G. Anti-endothelial cell antibodies in mixed connective tissue disease: Frequency and association with clinical symptoms. *Clin Exp Rheumatol*. 2004;22(4):409–15.
42. Mimura Y, Ihn H, Jinnin M, Asano Y, Yamane K, Tamaki K. Rheumatoid factor isotypes in mixed connective tissue disease. *Clin Rheumatol*. 2006 Jul;25(4):572–4.
43. Takasaki Y, Yamanaka K, Takasaki C, Matsushita M, Yamada H, Nawata M, et al. Anticyclic citrullinated peptide antibodies in patients with mixed connective tissue disease. *Mod Rheumatol*. 2004;14(5):367–75.
44. Doria A, Ruffatti A, Calligaro A, Del Ross T, Ghirardello A, De Zambiasi P, et al. Antiphospholipid antibodies in mixed connective tissue disease. *Clin Rheumatol*. 1992 Mar;11(1):48–50.
45. Komatireddy GR, Wang GS, Sharp GC, Hoffman RW. Antiphospholipid antibodies among anti-U1-70 kDa autoantibody positive patients with mixed connective tissue disease. *J Rheumatol*. 1997 Feb;24(2):319–22.
46. Gunnarsson R, El-Hage F, Aaløkken TM, Olgens, Reiser S, Lund MB, Rit, Garen T, et al. Associations between anti-Ro52 antibodies and lung fibrosis in mixed connective tissue disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2016;55(1):103–8.

47. Hameenkorpi R, Ruuska P, Forsberg S, Tiilikainen R, Makitalo R, Hakala M. More evidence of distinctive features of mixed connective tissue disease. *Scand J Rheumatol.* 1993;22(2):63–8.
48. Alarcon-Segovia D VM. Classification and diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. Amsterdam: Elsevier. 1987;33–40.
49. Sharp G. Diagnostic criteria for classification of MCTD. In: Kasukawa, R; Sharp G, editor. *Mixed connective tissue diseases and antinuclear antibodies.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division); 1987. p. 23–30.
50. Kasukawa, R; Tojo, T; Miyawaki S et al. Preliminary diagnostic criteria for classification of mixed connective tissue disease. In: Kasukawa, R; Sharp G, editor. *Mixed connective tissue disease and anti-nuclear antibodies.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division); 1987. p. 41–7.
51. Kahn, MF; Appelboom T. In: editors. In: Kahn MF, Peltier AP MO, editor. *Les Maladies Systemiques.* Paris: Flammarion; 1991. p. 545– 56.
52. Alarcón-Segovia D, Cardiel MH. Comparison between 3 diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. Study of 593 patients. *J Rheumatol.* 1989;16(3):328–34.
53. Amigues JM, Cantagrel A, Abbal M, Mazieres B. Comparative study of 4 diagnosis criteria sets for mixed connective tissue disease in patients with anti-RNP antibodies. Autoimmunity Group of the Hospitals of Toulouse. *J Rheumatol.* 1996 Dec;23(12):2055–62.
54. Cappelli S, Bellando Randone S, Martinović D, Tamas MM, Pasalić K, Allanore Y, et al. “To be or not to be,” ten years after: Evidence for mixed connective tissue disease as a distinct entity. *Semin Arthritis Rheum.* 2012;41(4):589–98.
55. Combe B, Landewé R, Lukas C, Bolosiu HD, Breedveld F, Dougados M, et al.

- EULAR recommendations for the management of early arthritis: report of a task force of the European Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis*. 2007;66(1):34–45.
56. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis* (Published online first 25th Oct 2013). 2013;1–18.
57. Kowal-Bielecka O, Distler O. Use of methotrexate in patients with scleroderma and mixed connective tissue disease. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28(5 SUPPL. 61).
58. Walker KM, Pope J. Expert agreement on EULAR/EUSTAR recommendations for the management of systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2011 Jul;38(7):1326–8.
59. Matucci-Cerinic M, Denton CP, Furst DE, Mayes MD, Hsu VM, Carpentier P, et al. Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(1):32–8.
60. Tashkin DP, Roth MD, Clements PJ, Furst DE, Khanna D, Kleerup EC, et al. Mycophenolate mofetil versus oral cyclophosphamide in scleroderma-related interstitial lung disease (SLS II): a randomised controlled, double-blind, parallel group trial. *Lancet Respir Med*. 2016;4(9):708–19.
61. Daoussis D, Liossis SNC, Tsamandas AC, Kalogeropoulou C, Kazantzi A, Sirinian C, et al. Experience with rituximab in scleroderma: Results from a 1-year, proof-of-principle study. *Rheumatology*. 2010;49(2):271–80.
62. Benedict N, Seybert A, Mathier MA. Evidence-Based Pharmacologic Management of Pulmonary Arterial Hypertension. *Clin Ther*. 2007;29(10):2134–53.

63. Kirby DF, Chatterjee S. Evaluation and management of gastrointestinal manifestations in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol*. 2014;26(6):621–9.
64. Yee C-S, Farewell V, Isenberg DA, Rahman A, Teh L-S, Griffiths B, et al. British Isles Lupus Assessment Group 2004 index is valid for assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2007 Dec;56(12):4113–9.
65. van Gestel AM, Haagsma CJ, van Riel PL. Validation of rheumatoid arthritis improvement criteria that include simplified joint counts. *Arthritis Rheum*. 1998 Oct;41(10):1845–50.
66. Gladman DD, Ibanez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol*. 2002 Feb;29(2):288–91.
67. Aletaha D, Martinez-Avila J, Kvien TK, Smolen JS. Definition of treatment response in rheumatoid arthritis based on the simplified and the clinical disease activity index. *Ann Rheum Dis*. 2012 Jul;71(7):1190–6.
68. Lage, LV; Caleiro, MTC; Carvalho J. Proposed disease activity criteria for mixed connective tissue disease. *Lupus*. 2010;19:223–4.
69. Chung L, Domsic RT, Lingala B, Alkassab F, Bolster M, Csuka ME, et al. Survival and predictors of mortality in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension: Outcomes from the pulmonary hypertension assessment and recognition of outcomes in Scleroderma registry. *Arthritis Care Res*. 2014;66(3):489–95.
70. Mukerjee D, St George D, Coleiro B, Knight C, Denton CP, Davar J, et al. Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: application of a registry approach. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(11):1088–93.
71. Chung L, Liu J, Parsons L, Hassoun PM, McGoon M, Badesch DB, et al.

- Characterization of connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension from REVEAL: Identifying systemic sclerosis as a unique phenotype. *Chest*. 2010;138(6):1383–94.
72. Lundberg I. Cardiac involvement in autoimmune myositis and mixed connective tissue disease. *Lupus*. 2005;14(9):708–12.
73. Tsai YY, Yang YH, Yu HH, Wang LC, Lee JH, Chiang BL. Fifteen-year experience of pediatric-onset mixed connective tissue disease. *Clin Rheumatol*. 2010;29(1):53–8.
74. Hetlevik SO, Flatø B, Rygg M, Nordal EB, Brunborg C, Hetland H, et al. Long-term outcome in juvenile-onset mixed connective tissue disease: a nationwide Norwegian study. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(1):159–65.
75. Berard RA, Laxer RM. Pediatric Mixed Connective Tissue Disease. *Curr Rheumatol Rep*. 2016;18(5).
76. Kotajima L, Aotsuka S, Sumiya M, Yokohari R, Tojo T, Kasukawa R. Clinical features of patients with juvenile onset mixed connective tissue disease: analysis of data collected in a nationwide collaborative study in Japan. *J Rheumatol*. 1996 Jun;23(6):1088–94.
77. Aalokken TM, Lilleby V, Soyseth V, Mynarek G, Pripp AH, Johansen B, et al. Chest abnormalities in juvenile-onset mixed connective tissue disease: assessment with high-resolution computed tomography and pulmonary function tests. *Acta Radiol*. 2009;50(4):430–6.
78. Ringold S, Weiss P, Beukelman T, Dewitt E, Ilowite N, Y K, et al. 2013 Update of the 2011 American College of Rheumatology Recommendations for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: Recommendations for the medical therapy of children with systemic juvenile idiopathic arthritis and tuberculosis screening among c. *Arthritis Rheum*. 2013;65(10):2499–512.

79. Cabrera N, Duquesne A, Desjonquères M, Larbre J-P, Lega J-C, Fabien N, et al. Tocilizumab in the treatment of mixed connective tissue disease and overlap syndrome in children. *RMD Open*. 2016;2(2):e000271.
80. Jansson AF, Sengler C, Kuemmerle-Deschner J, Gruhn B, Kranz AB, Lehmann H, et al. B cell depletion for autoimmune diseases in paediatric patients. *Clin Rheumatol*. 2011 Jan;30(1):87–97.
81. Aringer M, Steiner G, Smolen JS. Does mixed connective tissue disease exist? Yes. Vol. 31, *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2005. p. 411–20.
82. Smolen, JS; Steiner G. MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASE To Be Or Not To Be? *Arthritis Rheum*. 1998;41(5):768–77.
83. Swanton J, Isenberg D. Mixed connective tissue disease: Still crazy after all these years. *Rheum Dis Clin North Am*. 2005;31(3):421–36.
84. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997;40(9):1725.
85. Petri, M Orbai, AM Alarcon G. Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2677–86.
86. Hoffmann-Vold AM, Gunnarsson R, Garen T, Midtvedt Ø, Molberg Ø. Performance of the 2013 American college of rheumatology/European league against rheumatism Classification criteria for systemic sclerosis (SSc) in large, well-defined cohorts of SSc and mixed connective tissue disease. *J Rheumatol*. 2015;42(1):60–3.
87. López-Longo, F. J., Fernández, J., Monteagudo, I., Rodríguez-Mahou, M., Atrio, A. S., Pérez T. Evolución clínica y serológica en pacientes con enfermedad mixta del tejido conjuntivo. *Rev Clín Esp*. 1994;(194):682–8.

88. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006 Feb;4(2):295–306.
89. Rodriguez-Garcia JL, Bertolaccini ML, Cuadrado MJ, Sanna G, Ateka-Barrutia O, Khamashta M a. Clinical manifestations of antiphospholipid syndrome (APS) with and without antiphospholipid antibodies (the so-called “seronegative APS”). *Ann Rheum Dis.* 2012;71(2):242–4.
90. Martínez-Barrio J, Ovalles-Bonilla JG, López-Longo FJ, González CM, Montoro M, Valor L, et al. Juvenile, adult and late-onset systemic lupus erythematosus: A long-term follow-up study from a geographic and ethnically homogeneous population. *Clin Exp Rheumatol.* 2015;33(6):788–94.
91. Carreño L, López-Longo FJ, Monteagudo I, Rodríguez-Mahou M, Bascones M, González CM, et al. Immunological and clinical differences between juvenile and adult onset of systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 1999;8(4):287–92.
92. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988 Mar;31(3):315–24.
93. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 1980 May;23(5):581–90.
94. Tanimoto K, Nakano K, Kano S, Mori S, Ueki H, Nishitani H, et al. Classification criteria for polymyositis and dermatomyositis. *J Rheumatol.* 1995 Apr;22(4):668–74.
95. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl*

- J Med. 1975 Feb;292(7):344–7.
96. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). N Engl J Med. 1975 Feb;292(8):403–7.
 97. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. Ann Rheum Dis. 2002 Jun;61(6):554–8.
 98. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. Arthritis Rheum. 1999 Jul;42(7):1309–11.
 99. Clements PJ, Furst DE, Campion DS, Bohan A, Harris R, Levy J, et al. Muscle disease in progressive systemic sclerosis: diagnostic and therapeutic considerations. Arthritis Rheum. 1978;21(1):62–71.
 100. Nimelstein SH, Brody S, McShane D, Holman HR. Mixed connective tissue disease: a subsequent evaluation of the original 25 patients. Medicine (Baltimore). 1980 Jul;59(4):239–48.
 101. Paradowska-Gorycka A. U1-RNP and TLR receptors in the pathogenesis of mixed connective tissue diseasePart I. The U1-RNP complex and its biological significance in the pathogenesis of mixed connective tissue disease. Reumatologia. 2015;53(2):94–100.
 102. Faria AC, Barcellos KSA, Andrade LEC. Longitudinal fluctuation of antibodies to extractable nuclear antigens in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 2005 Jul;32(7):1267–72.
 103. Ihn H, Yamane K, Yazawa N, Kubo M, Fujimoto M, Sato S, et al. Distribution and antigen specificity of anti-U1RNP antibodies in patients with systemic sclerosis.

- Clin Exp Immunol. 1999 Aug;117(2):383–7.
104. Brouwer R, Hengstman GJD, Egberts V, Ehrfeld H, Bozic B, Ghirardello A, et al. Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis. *Ann Rheum Dis.* 2001;60:116–23.
 105. Burdt MA, Hoffman RW, Deutscher SL, Wang GS, Johnson JC, Sharp GC. Long-term outcome in mixed connective tissue disease: longitudinal clinical and serologic findings. *Arthritis Rheum.* 1999;42(5):899–909.
 106. Hoet RM, Koornneef I, De Rooij DJ, Van de Putte LB, Van Venrooij WJ. Changes in anti-U1 RNA antibody levels correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus overlap syndrome. *Arthritis Rheum.* 1992;35(10):1202–10.
 107. Carpintero MF, Martinez L, Fernandez I, Romero ACG, Mejia C, Zang YJ, et al. Diagnosis and risk stratification in patients with anti-RNP autoimmunity. *Lupus.* 2015 Sep;24(10):1057–66.
 108. Gendi NS, Welsh KI, Van Venrooij WJ, Vancheeswaran R, Gilroy J, Black CM. HLA type as a predictor of mixed connective tissue disease differentiation. Ten-year clinical and immunogenetic followup of 46 patients. *Arthritis Rheum.* 1995 Feb;38(2):259–66.
 109. Lundberg I, Hedfors E. Clinical course of patients with anti-RNP antibodies. A prospective study of 32 patients. *J Rheumatol.* 1991 Oct;18(10):1511–9.
 110. Furtado RN V, Pucinelli MLC, Cristo V V, Andrade LEC, Sato EI. Scleroderma-like nailfold capillaroscopic abnormalities are associated with anti-U1-RNP antibodies and Raynaud's phenomenon in SLE patients. *Lupus.* 2002;11(1):35–41.
 111. Gunnarsson R, Hetlevik SO, Lilleby V, Molberg Ø. Mixed connective tissue disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2016;30(1):95–111.

112. Rúa-Figueroa I, López-Longo FJ, Calvo-Alén J, Galindo-Izquierdo M, Loza E, García de Yébenes MJ, et al. Registro nacional de pacientes con lupus eritematoso sistémico de la Sociedad Española de Reumatología: objetivos y metodología. *Reumatol Clínica*. 2014 Jan;10(1):17–24.
113. Rúa-Figueroa Í, Richi P, López-Longo FJ, Galindo M, Calvo-Alén J, Olivé-Marqués A, et al. Comprehensive description of clinical characteristics of a large systemic lupus erythematosus cohort from the Spanish Rheumatology Society Lupus Registry (RELESSER) with emphasis on complete versus incomplete lupus differences. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Jan;94(1):e267.
114. Nuño L, Joven B, Carreira P, Maldonado V, Larena C, Llorente I, et al. Multicenter Registry on Inflammatory Myositis From the Rheumatology Society in Madrid, Spain: Descriptive Analysis. *Reumatol Clin*. 2016 Sep;
115. Cavagna L, Nuno L, Scire CA, Govoni M, Longo FJL, Franceschini F, et al. Serum Jo-1 Autoantibody and Isolated Arthritis in the Antisynthetase Syndrome: Review of the Literature and Report of the Experience of AENEAS Collaborative Group. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017 Feb;52(1):71–80.